

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Ekkehard LEBERER et al.
Title: POTASSIUM CHANNEL
MUTANTS OF THE YEAST
SACCHAROMYCES CEREVISIAE
AND THEIR USE FOR SCREENING
EUKARYOTIC POTASSIUM
CHANNELS

#8



Appl. No.: Unassigned

Filing Date: 1/11/2001

Examiner: Unassigned

Art Unit: Unassigned

CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

In support of this claim, filed herewith is a certified copy of said original foreign application:

- Federal Republic of Germany Patent Application No. 100 00 651.5 filed January 11, 2000.

Respectfully submitted,

Date

January 11, 2001

By

Patricia D. Granados

FOLEY & LARDNER
Washington Harbour
3000 K Street, N.W., Suite 500
Washington, D.C. 20007-5109
Telephone: (202) 672-5477
Facsimile: (202) 672-5399

Patricia D. Granados
Attorney for Applicant
Registration No. 33,683



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 100 00 651.5

Anmeldetag: 11. Januar 2000

Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Kalium-Kanal-Mutanten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und deren Verwendung für das Screening von eukaryotischen Kaliumkanälen

IPC: C 12 Q, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 07. September 2000
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

Hoiß

Beschreibung

- 5 Kalium-Kanal-Mutanten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und deren Verwendung für das Screening von eukaryotischen Kaliumkanälen

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren und Aktivatoren eukaryotischer Kaliumkanäle, wobei eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle verwendet wird, deren endogene Kaliumkanäle TRK1, TRK2 und TOK1 nicht funktionell exprimiert werden, die aber einen zu untersuchenden eukaryotischen Kaliumkanal heterolog exprimiert. Desweiteren sind mutierte *S. cerevisiae* Zellen, die TRK1, TRK2 und TOK1 nicht exprimieren, Gegenstand der Erfindung sowie die Herstellung und Verwendung dieser mutierten *S. cerevisiae* Zellen.

15

Jede Zelle ist von einer Plasmamembran umschlossen, die eine Dicke von etwa 6 - 8 nm besitzt. Diese Membran legt die Ausmaße der Zelle fest und trennt den Inhalt der Zelle von ihrer Umgebung. Alle biologischen Membranen bestehen aus einer zusammenhängenden Doppelschicht von Lipidmolekülen, in die verschiedene Membranproteine eingelagert sind. Während die Lipid-Doppelschicht die Grundstruktur biologischer Membranen bestimmt, sind die Proteine für die meisten ihrer Funktionen verantwortlich. Wegen ihres hydrophoben Innern wirkt die Lipid-Doppelschicht für die meisten polaren Moleküle als eine undurchlässige Barriere. Erst Membranproteine wie Rezeptoren, Ionenkanäle und Transporter erlauben einen kontrollierten Ionenfluß und den Transport von polaren Molekülen (Alberts *et al.*, 1995). Damit tragen Proteine zu unterschiedlichen Ionenkonzentrationen im Innern und in der Umgebung der Zelle bei und steuern den Eintritt von Nährstoffen und den Austritt von Abbaustoffen.

25

Die meisten Membranproteine durchspannen die Plasmamembran mehrmals, so auch die Ionenkanäle, die damit zur Gruppe der integralen Membranproteine gezählt werden. Diese Proteine besitzen sowohl hydrophobe Bereiche, die die Lipid-Doppelschicht durchspannen, als auch hydrophile Abschnitte, die auf beiden Seiten der Membran dem wäßrigen Milieu ausgesetzt sind. Ionenkanäle kommen in allen

30

Zellen vor und sind in Nervenzellen für die Generierung von Aktionspotentialen verantwortlich (Alberts *et al.*, 1995). Ionenkanäle können aufgrund ihrer unterschiedlichen Ionenselektivität und anhand ihrer unterschiedlichen Öffnungs- und Schließmechanismen unterschieden werden.

- 5 Kaliumkanäle sind ubiquitäre Membranproteine, die sowohl in erregbaren, als auch in nicht erregbaren Zellen vorkommen (for review see (Jan, L. Y. *et al.*, 1997). Offene Kaliumkanäle bewegen das Membranpotential näher zum Kalium-Gleichgewichtspotential und damit weg vom Schwellenpotential zur Auslösung eines Aktionspotentials. Kaliumkanäle festigen also das Ruhemembranpotential,
- 10 repolarisieren die Zelle und bestimmen damit die Länge und die Frequenz von Aktionspotentialen (Sanguinetti, M. C. *et al.*, 1997; Wilde, A. A. *et al.*, 1997; Wang, Q. *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Funktionen stellen Kaliumkanäle auch die molekulare Ursache für die Entstehung vieler pathologischer Situationen dar, und sind somit ein interessantes Ziel für die Entwicklung therapeutischer Agens.

15

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (nachfolgend *S. cerevisiae*) besitzt drei Kaliumkanäle, TRK1, TRK2 und TOK1. Der Kaliumkanal TRK1 (YJL129c) gehört zur Familie der "Major Facilitator" Kaliumpermeasen und ist als hochaffiner Kaliumtransporter verantwortlich für den Einstrom von Kaliumionen aus dem Medium

20 in die Zelle (Gaber, R. F. *et al.*, 1988; Ko, C. H. *et al.*, 1990; Ko, C. H. *et al.*, 1991). Die Deletionsmutante $\Delta trk1$ ist auf mindestens 10 mM K^+ überlebensfähig und stark polarisiert (Gaber, R. F. *et al.*, 1988; Madrid, R. *et al.*, 1998). Auf 1 mM K^+ überlebt ein $\Delta trk1$ Stamm nicht (Gaber, R. F. *et al.*, 1988).

- Der Kaliumkanal TRK2 (YKR050w) gehört ebenfalls zur Familie der "Major
- 25 Facilitator" -Kaliumpermeasen und ist als niederaffiner Kaliumtransporter verantwortlich für den Einstrom von Kaliumionen aus dem Medium in die Zelle (Ko, C. H. *et al.*, 1990; Ko, C. H. *et al.*, 1991; Madrid, R. *et al.*, 1998). Der Phänotyp der $\Delta trk2$ Deletionsmutante ist weniger stark ausgeprägt als für die $\Delta trk1$ -Mutante. Ein $\Delta trk2$ Stamm überlebt auch auf 1 mM K^+ (Ko, C. H. *et al.*, 1990; Madrid, R. *et al.*,
- 30 1998).

Der Kaliumkanal TOK1 ist verantwortlich für den Einstrom von Kaliumionen aus dem Medium in die Zelle (Ketchum, K. A. *et al.*, 1995; Fairman, C. *et al.*, 1999). Die

Richtung des Ionenströme ist jedoch reversibel, und kann daher je nach Kulturbedingungen auch in die andere Richtung leiten (Fairman, C. et al., 1999).

Die Deletionsmutante $\Delta trk1 \Delta trk2$ wurde schon wiederholt beschrieben (Ko, C. H. et al., 1990; Ko, C. H. et al., 1991; Madrid, R. et al., 1998; Fairman, C. et al., 1999).

- 5 Diese Mutante wurde in der Vergangenheit auch dazu benutzt, K^+ -Kanäle höherer Eukaryoten durch Komplementation des Phänotyps zu identifizieren und zu beschreiben. Bislang berichtet wurde die Komplementation durch die *inward rectifier*-Kanäle KAT1 cDNA (*Arabidopsis thaliana*), HKT1 cDNA (*Triticum aestivium*), IRK1 (*Mus musculus*) und HKT1 K^+/Na^+ -Transporter (*Triticum aestivium*) (Tang, W. et al., 10 1995; Smith, F. W. et al., 1995; Goldstein, S. A. et al., 1996; Nakamura, R. L. et al., 1997). Zudem wurde beschrieben, daß Überexpression von TOK1 und dessen Homolog ORK1 aus *Drosophila melanogaster*, in der Hefezelle den Wachstumsdefekt der $\Delta trk1 \Delta trk2$ -Mutante komplementieren kann (Fairman, C. et al., 1999).

15

Die Untersuchung von eukaryotischen Kaliumkanälen und Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität dieser Kaliumkanäle modifizieren können gestaltet sich jedoch schwierig, da z. B. die humanen Kanäle HERG1 oder Kv1.5 den lethalen Phänotyp von $\Delta trk1 \Delta trk2$ auf 5 mM KCl nicht komplementieren können. Somit ist 20 kein Screening möglich.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren eines eukaryotischen Kaliumkanals, wobei

25

- a) eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle verwendet wird, die die drei endogenen Kaliumkanäle TRK1, TRK2 und TOK1 nicht exprimiert;
 - b) in dieser mutierten *S. cerevisiae* Zelle ein eukaryotischer Kaliumkanal heterolog exprimiert wird;
 - c) die mutierte *S. cerevisiae* Zelle mit einer zu untersuchenden Substanz inkubiert wird;
- 30 und
- d) der Effekt der zu untersuchenden Substanz auf den eukaryotischen Kaliumkanal bestimmt wird.

In der in dem Verfahren verwendeten mutierte *S. cerevisiae* Zelle sind die Gene TRK1, TRK2 und TOK1 (SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 und SEQ ID NO. 3) ausgeschaltet ($\Delta trk1$, $\Delta trk2$, $\Delta tok1$), vorzugsweise durch knock out, wobei vorzugsweise große Teile der Gene deletiert werden.

5

Der in dem Verfahren verwendete eukaryotische Kaliumkanal ist der Kaliumkanal, der untersucht werden soll – der Kanal, für den Inhibitoren oder Aktivatoren identifiziert werden sollen.

10 Der eukaryotische Kaliumkanal ist beispielsweise ein humaner HERG1, humaner Kv1.5 oder gPIRK1 (Meerschweinchen) Kanal. Der eukaryotische Kaliumkanal hat vorzugsweise die natürliche Sequenz des betreffenden Kaliumkanals, beispielsweise kodiert durch eine der Sequenzen SEQ ID NO. 4, SEQ ID. NO. 5 oder SEQ ID NO. 6. Die natürliche Sequenz des Kaliumkanals kann aber auch modifiziert, z.B. mutiert
15 sein.

Vorzugsweise wird die Nukleotidsequenz, die für den eukaryotischen Kaliumkanal kodiert, in ein Hefe Expressionsplasmid, beispielsweise p423 GPD3 oder beispielsweise der pRS 42x– oder pRS 32x-Serie integriert und das rekombinante Expressionsplasmid in die mutierte *S. cerevisiae* Zelle eingebracht.

20

Mit dem Verfahren sollen Substanzen identifiziert werden, die auf den eukaryotischen Kaliumkanal einen Effekt haben. Diese Substanzen inhibieren das Wachstum der mutierten *S. cerevisiae* Zelle. Eine zu untersuchende Substanz, die den heterolog exprimierten eukaryotischen Kaliumkanal inhibiert, bewirkt, daß sich
25 die mutierte *S. cerevisiae* Zelle – da sie keine endogenen Kaliumkanäle exprimiert - schlechter bzw. langsamer teilt und vermehrt bzw. in einer besonderen Ausführungsform der Erfindung abstirbt.

Der Effekt der zu untersuchenden Substanz kann beispielsweise direkt über
30 Messung der optimalen Dichte bei 600 nm oder mit Hilfe eines konstitutiv in der mutierten *S. cerevisiae* Zelle exprimierten Wachstumsreporters bestimmt werden. Vorzugsweise kodiert der konstitutive exprimierte Wachstumsreporter für ein Protein, das entweder selbst Fluoreszenz oder Lumineszenz zeigt oder das an einer

Reaktion beteiligt ist, die ein Fluoreszenz oder Lumineszenz-Signal liefert. Die für den Wachstumsreporter kodierende Sequenz liegt vorzugsweise in einem Vektor vor. Als Wachstumsreporter sind beispielsweise das LacZ Gen für β -Galaktosidase oder die saure Phosphatase PH03 geeignet, die unter der Kontrolle eines

5 konstitutiven Hefe Promotors exprimiert werden. Aus der meßbaren Fluoreszenz oder Lumineszenz kann auf die Zellzahl der mutierten *S. cerevisiae* Zellen geschlossen werden. Wird keine bzw. weniger Fluoreszenz bzw. Lumineszenz gemessen, dann sind in der betreffenden Probe weniger mutierte *S. cerevisiae* Zellen vorhanden. Sind weniger mutierte *S. cerevisiae* Zellen vorhanden, dann hat

10 die zu untersuchende Substanz einen inhibierenden Effekt auf den eukaryotischen Kaliumkanal.

Die beschriebenen Verfahren lassen sich besonders gut automatisieren und für eine Vielzahl von zu untersuchenden Substanzen parallel durchführen. In besonderen

15 Ausführungsformen der Erfindung werden zwei oder mehrere Verfahren vergleichend durchgeführt, wobei in zwei oder mehr mutierte *S. cerevisiae* Zellen vergleichend analysiert werden. Diese mutierten *S. cerevisiae* Zellen werden vorzugsweise mit der gleich Menge an zu untersuchender Substanz inkubiert, exprimieren aber den betreffenden eukaryotischen Kaliumkanal in unterschiedlichem

20 Maße. In einer anderen besonderen Ausführungsform der Erfindung werden mutierte *S. cerevisiae* Zellen vergleichend analysiert, die den betreffenden eukaryotischen Kaliumkanal in gleichem Maße exprimieren, aber mit unterschiedlichen Mengen an zu untersuchender Substanz inkubiert werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle, in der die endogenen Kaliumkanäle TRK1, TRK2 und TOK1 nicht exprimiert werden. Eine weitere Ausführungsform betrifft eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle, in der die Gene TRK1, TRK2 und TOK1 ausgeschaltet sind; vorzugsweise sind diese Gene durch

25 knock out ganz oder teilweise entfernt oder wurden mutiert. Eine weitere

30 Ausführungsform betrifft eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle, die nach dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) unter DSM 13197 hinterlegt ist.

Eine besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle, die einen eukaryotischen Kaliumkanal heterolog exprimiert, wobei der eukaryotische Kaliumkanal vorzugsweise ein humaner Kaliumkanal ist, beispielsweise ein HERG1, Kv1.5 oder gpIRK1 oder ein humaner Kv 4.3 [Genbank
 5 Zugangsnummer AF 187963], TASK (Genbank Zugangsnummer AF 006823] oder HAC1 [Genbank Zugangsnummer AC 005577] ist und wobei der Kaliumkanal die natürliche Sequenz hat oder mutiert sein kann.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer mutierten *S. cerevisiae* Zelle, die die Kaliumkanäle TRK, TRK2 und TOK1 nicht exprimiert, wobei
 10 die Gene TRK1, TRK2 und TOK1 durch knock-out zerstört bzw. deletiert werden. Die mutierte *S. cerevisiae* Zelle kann beispielsweise in Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität des eukaryotischen Kaliumkanals inhibieren oder aktivieren, verwendet werden oder Bestandteil eines Test-Kits sein, der z.B. zur
 15 Bestimmung von toxischen Substanzen verwendet werden kann.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Identifizierung von Aktivatoren eines eukaryotischen Kaliumkanals, wobei

- 20 a) eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle verwendet wird, die die drei endogenen Kaliumkanäle TRK1, TRK2 und TOK1 nicht exprimiert;
- b) in dieser mutierten *S. cerevisiae* Zelle ein eukaryotischer Kaliumkanal heterolog exprimiert wird;
- c) die mutierte *S. cerevisiae* Zelle mit einer zu untersuchenden Substanz inkubiert wird;
- und
- d) der Effekt der zu untersuchenden Substanz auf den eukaryotischen Kaliumkanal bestimmt wird.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Identifizierung von Aktivatoren
 30 eines eukaryotischen Kaliumkanals, wobei

- a) eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle verwendet wird, die die drei endogenen Kaliumkanäle TRK1, TRK2 und TOK1 nicht exprimiert;
- b) in dieser mutierten *S. cerevisiae* Zelle ein eukaryotischer Kaliumkanal heterolog exprimiert wird;

- c) die mutierte *S. cerevisiae* Zelle in Gegenwart eines Inhibitors des eukaryotischen Kaliumkanals mit einer zu untersuchenden Substanz inkubiert wird;
und
- 5 d) der Effekt der zu untersuchenden Substanz auf den eukaryotischen Kaliumkanal bestimmt wird.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, wobei

- 10 a) ein Inhibitor eines eukaryotischen Kaliumkanals identifiziert wird ,
b) der Inhibitor nach bekannten chemischen-Verfahren hergestellt oder isoliert wird, und
c) der Inhibitor mit physiologisch verträglichen Zusatzstoffen versetzt wird.
- 15 Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, wobei
- a) ein Aktivator eines eukaryotischen Kaliumkanals identifiziert wird ,
b) der Aktivator nach bekannten chemischen Verfahren hergestellt oder isoliert wird, und
20 c) der Aktivator mit physiologisch verträglichen Zusatzstoffen versetzt wird.

Abbildungen :

- 25 **Figur 1:** Diagnostische PCR für die Bestätigung des Dreifach-Knockouts. Erläuterung der Reihen/Gelspuren siehe Text Beispiel 2, dreifach knock out.

Figur 2: Wachstum der Stämme YM168 ($\Delta trk1 \Delta trk2$) und YM182 ($\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$) auf DPM-Medium mit definierten Konzentrationen an KCl bei pH 6.5.

30

Figur 3: Wachstum der Stämme YM189 bzw. YM190 (in $\Delta trk1 \Delta trk2$), und YM194 bzw. YM195 (in $\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$) auf DPM Medium mit 5 mM KCl + 2 mM RbCl bei pH 6.5.

Figur 4: Wachstum der Stämme YM189 bzw. YM191 (in $\Delta trk1 \Delta trk2$), und YM194 bzw. YM196 (in $\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$) auf DPM Medium mit 5 mM KCl + 2 mM CsCl bei pH 6.5.

- 5 Figur 5: Wachstum der Stämme YM194 bzw. YM195 (in $\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$) in DPM Medium mit 5 mM KCl + 1 mM RbCl bei pH 6.5. („KON“ = Kontrolle)

Figur 6: Wachstum der Stämme YM194 bzw. YM196 (in $\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$) in DPM Medium mit 5 mM KCl + 1 mM CsCl bei pH 6.5. („KON“ = Kontrolle)

10

Beispiele:

Material und Stämme

15

Medien

YPD (Hefe-Vollmedium): 1% Bacto Yeast Extract, 2% Bacto-Peptone, 2% Bacto-Agar, 2% Glucose.

20 SC (synthetic complete) Medium: 0.67% Bacto-Yeast Nitrogen Base, Aminosäuren, 2% Glucose.

Sporulationsmedium: 1% Kaliumacetat, Aminosäuren.

5-FOA Medium: 0.67% Bacto-Yeast Nitrogen Base, Aminosäuren, Uracil (50 $\mu\text{g/ml}$), 2% Zucker (Galactose oder Glucose), 0,1% 5-FOA

Alle Medien sind beschrieben in: (Fink, G. R. et al., 1991)

25

Aminosäure Dropout-Mix:

L-Alanin 2 g; L-Arginin 2 g; L-Asparagin*H₂O 2.27 g; L-Asparaginsäure 2 g;

L-Cystein*HCl 2.6 g; L-Glutamin 2 g; L-Glutaminsäure 2 g; Glycin 2 g; myo-Inositol 2 g; L-Isoleucin 2 g; L-Methionin 2 g; PABA 0.2 g; L-Phenylalanin 2 g; L-Prolin 2 g;

30 L-Serin 2 g; L-Threonin 2 g; L-Tyrosin 2 g; L-Valin 2 g.

Stocklösungen für Marker-Aminosäuren:

	mM	g/l	
Adenin (100x)	30	5.53	erwärmen (bis max.60°C)
Leucin (60x)	100	13.12	erwärmen
Lysin (100x)	100	18.26	-
Histidin (200x)	60	12.57	-
Tryptophan (100x)	40	8.17	-
Uracil (100x)	20	2.24	in 0.5% NaHCO ₃ -Lösung erwärmen

Vitamin Stock (50 ml): Biotin 20 µg/l; Ca-Pantothenate 40 µg/l; Thiamine 40 µg/l.

5

Defined potassium medium (DPM): für 1.5 l (2x-Stock):

(NH₄)₂HPO₄ 8mM 3.2 g

(NH₄)₂SO₄ 29 mM 11.5 g

MgSO₄ 2 mM 0.8 g (bzw. 6 ml von 1 M Stock)

10 CaCl₂ 0.2 mM 90 µg (bzw. 1.2 ml von 0.5 M Stock)

Vitamine Stock 120 µl

Aminosäure Dropout-Mix 6 g

Lysin 330 ml von 100x Stock

Adenin 0.9 mM 30 ml von 100x Stock

15 → mit HCl pH 6.5 (bzw. einen anderen pH-Wert) einstellen, autoklavieren

Glucose 2 % von 40 % Stock

KCl von 1 M Stock

essentielle Aminosäuren (außer Lys/Ade) von Stocks

Agar

20

Puffer und Lösungen:

TE-Puffer: Tris/HCl (pH 7.5) 10 mM; EDTA (pH 8.0) 1 mM;

TAE-Puffer: Tris 40 mM; EDTA 1 mM; Essigsäure 0.2 mM;

SSC-Puffer (20x): NaCl 3 M; Natriumcitrat*2 H₂O 0.3 M;

Gel-Ladepuffer: Bromphenolblau 0.05% (w/v); Sucrose 40% (w/v); EDTA, pH 8.0 0.1 M; SDS 0.5% (w/v);

Hybridisationspuffer: SSC 5x; SDS 0.1% (w/v); Dextranulfat 5% (w/v); Stopreagenz

5 1:20;

Puffer A (steril): Tris-HCl 100 mM; NaCl, pH 9.5 300 mM;

Depurinationslösung: HCl 0.25 M;

Denaturierungslösung: NaCl 1.5 M; NaOH 0.5 M;

Neutralisationslösung: NaCl 1.5 M; Tris, pH 8.0 0.5 M.

10

Oligonukleotide (Primer für PCR's):

Name	Sequenz (5' → 3')	RE
TRK1-FL-BamHI-Fo	SEQ ID NO. 7: GCG'GATCCATGCATTTTAGAAGAACGATGAGTAG	BamHI
TRK1-FL-PstI-Re	SEQ ID NO. 8: AGGTTCTGCTGCA'GTTGGTGT	PstI
TRK1-FL-PstI-Fo	SEQ ID NO. 9: ACACCAACTGCA'GCAGAACCT	PstI
TRK1-FL-XhoI-Re	SEQ ID NO. 10: CGC'TCGAGTTAGAGCGTTGTGCTGCTCCT	XhoI
TRK1-Dia-Fo	SEQ ID NO. 11: CCTTACCATTAGCATCACTGAT	---
TRK1-Dia-Re1	SEQ ID NO. 12: CTATTAACCATTCTCCGCTG	---
URA-Rev	SEQ ID NO. 13: GATTTATCTTCGTTTCCTGCAGGT	---
TRK2-DEL-5-Fo-B	SEQ ID NO. 14: CAC'GTACGTCCAGCACAATTTACAAACAGCT	BsWI
TRK2-DEL-5-Re	SEQ ID NO. 15: CAG'TCGACCTGGATGACGTCCTCTTAGCTG	SaII
TRK2-DEL-3-Fo	SEQ ID NO. 16: CAGAT'ATCATGCTGCCAAGTGACAACTG	EcoRV
TRK2-DEL-3-Re	SEQ ID NO. 17: TCA'CTAGTTGTTGATGGCTTTGGTTGGT	SpeI
TRK2-Dia-Fo	SEQ ID NO. 18: GCGAAGAATAGGATGAGATGTG	---
TRK2-Dia-Re1	SEQ ID NO. 19: TTGTCGTGGGTCTTCTCTGG	---
KAN-Rev	SEQ ID NO. 20: GCTACCTTTGCCATGTTTCAGAA	---
TOK1-DEL-5-Fo	SEQ ID NO. 21: CAC'GTACGGCAAATTTATCGAGACTCTGCGA	BsWI

TOK1-DEL-5-Re	SEQ ID NO. 22: AGG'TCGACCATATTGCCATATCCCAGCGT	<i>Sall</i>
TOK1-DEL-3-Fo	SEQ ID NO. 23: TGGAT'ATCACCTGATACGCCC	<i>EcoR</i> V
TOK1-DEL-3-Re	SEQ ID NO. 24: CAA'CTAGTGCATACCAGTAGTATGAGACATGCTTG	<i>SpeI</i>
TOK1-Dia-Fo	SEQ ID NO. 25: CCTGAGTACTCAGTACCATCTTG	---
TOK1-Dia-Re1	SEQ ID NO. 26: CTGTAGATGCTGGGCATG	---
Kv1.5-GFP-Fo	SEQ ID NO. 27: TACG'TCGACATGGAGATCGCCCTGGTG	<i>Sall</i>
Kv1.5-GFP-Re	SEQ ID NO. 28: TACG'TCGACATCTGTTTCCCGGCTGGTG	<i>Sall</i>
HERG1-GFP-Fo	SEQ ID NO. 29: TACAT'CGATATGCCGGTGCGGAGGG	<i>Clal</i>
HERG1-GFP-Re	SEQ ID NO. 30: TACG'TCGACACTGCCCGGGTCCGA	<i>Sall</i>

Vektoren:

Bakterielle Vektoren

Name	Größe (bp)	Gene
pcDNA3 (Invitrogen)	5446	CMV-Prom., T7-Prom., Polylinker, Sp6-Prom., BGH poly (A), SV40 Prom., SV 40 ori, Neomycin ^R , SV 40 poly (A), ColE1 ori, Amp ^R
pcDNA3.1 (+/-) (Invitrogen)	5432	CMV-Prom., T7-Prom./priming site, MCS, pcDNA3.1 reverse priming site, BGH poly (A), F1 ori, SV40 Prom., SV 40 ori, Neomycin ^R , SV 40 poly (A), ColE1 ori, Amp ^R
pUG6	4009	<i>loxP</i> -TEF2-Prom.-kanMX- <i>loxP</i> -TEF2-Term., ori, Amp ^R
pCR®-Blunt II-TOPO	3519	<i>lac</i> -Prom./Op., M13 Reverse prim. site, LacZ- α ORF, SP6-Prom. prim. site, MCS, TOPO™-Cloning site, T7 Prom. prim. site, M13 (-20) Forward prim. site, M13 (-40) prim. site, Fusion point, <i>ccdB</i> lethal gene ORF, <i>kan</i> gene, (<i>kan</i> -Prom., Kanamycin resistance gene ORF), Zeocin resistance ORF, pMB1 origin (pUC-derived)
pCR® II-TOPO	3900	LacZ- α gene, M13 Reverse prim. site, SP6-Prom., MCS, T7-Prom., M13 (-20) Forward prim. site, M13 (-40) Forward prim. site, f1 origin, Kanamycin resistance

		ORF, Ampicillin resistance ORF, pMB1 origin (pUC-derived)
--	--	---

Hefe Vektoren

Name	Größe (bp)	Gene
pSH47	6786	CEN6/ARSH4, URA3, CYC1-Term., CRE, GAL1-Prom., Amp
p414 GAL1	5474	CEN6/ARSH4, TRP1, CYC1-Term., GAL1-Prom., Amp ^R
p416 GAL1	5584	CEN6/ARSH4, URA3, CYC1-Term., GAL1-Prom., Amp ^R
p416 ADH	6624	CEN6/ARSH4, URA3, CYC1-Term., ADH-Prom., Amp ^R
p423 GPD3	6678	2 μ , HIS3, CYC1-Term., GPD3-Prom., Amp ^R
p426 GAL1	6417	2 μ , URA3, CYC1-Term., GAL1-Prom., Amp ^R
p426 GAL1-yEGFP3	7140	2 μ , URA 3, CYC1-Term., yEGFP3, GAL1-Prom., Amp ^R
p426 GAL1-SP-yEGFP3	7227	2 μ , URA 3, CYC1-Term., N-terminal 24 aa von Ste2, yEGFP3, GAL1-Prom., Amp ^R

5 Stämme:

Bakterienstämme: DH5 α ; One Shot™ TOP10 (Invitrogen)

10 Hefestämme:

Alle für diese Arbeit generierten Hefestämme basieren auf dem diploiden

Wildtypstamm:

W303 MATa/ α ade2, his3-11-15, leu2-3-112, trp1-1, ura3-1, can1-100;

ATCC-Nr. 208352.

15

Stamm	Urspr. Name	Mating-typ	Gene
YM 96	w303	MATa/ α	ade2, his3-11-15, leu2-3-112, trp1-1, ura3-1, can1-100

YM 97	w303	MAT α	ade2, his3-11-15, leu2-3-112, trp1-1, ura3-1, can1-100
YM 98	w303	MAT α	ade2, his3-11-15, leu2-3-112, trp1-1, ura3-1, can1-100

Die folgenden Hefestämme wurden generiert:

Stamm	Urspr. Name	Mating - typ	Gene (außer ade2, his3-11-15, leu2-3-112, trp1-1, ura3-1, can1-100)
YM 123	Δ trk1 in YM 96	MAT α	trk1::hisG-URA3-hisG
YM 124	Δ trk1 in YM 96	MAT α	trk1::hisG-URA3-hisG
YM 139	Δ tok1 in YM 96	MAT α/α	tok1::loxP-KanMX-loxP
YM140	Δ tok1 in YM 123	MAT α	trk1::hisG-URA3-hisG, tok1::loxP-KanMX-loxP
YM 141	Δ tok1 in YM 123	MAT α	trk1::hisG-URA3-hisG, tok1::loxP-KanMX-loxP
YM 142	Δ tok1 in YM 96	MAT α/α	tok1::loxP-KanMX-loxP
YM 143	Δ tok1 in YM 124	MAT α	trk1::hisG-URA3-hisG, tok1::loxP-KanMX-loxP
YM144	Δ tok1 in YM 124	MAT α	trk1::hisG-URA3-hisG, tok1::loxP-KanMX-loxP
YM 154	Δ tok1 in YM 96	MAT α	tok1::loxP-KanMX-loxP
YM 155	Δ tok1 in YM 96	MAT α	tok1::loxP-KanMX-loxP
YM 156	Δ tok1 in YM 96	MAT α	tok1::loxP-KanMX-loxP
YM 157	Δ tok1 in YM 96	MAT α	tok1::loxP-KanMX-loxP
YM 158	Δ trk2 in YM 96	MAT α	trk2::loxP-KanMX-loxP
YM 159	Δ trk2 in YM 96	MAT α	trk2::loxP-KanMX-loxP
YM 160	Δ trk2 in YM 96	MAT α	trk2::loxP-KanMX-loxP
YM 161	Δ trk2 in YM 96	MAT α	trk2::loxP-KanMX-loxP
YM 162	Δ tok1 in YM 123	MAT α	trk1::hisG, tok1::loxP
YM 163	Δ tok1 in YM 123	MAT α	trk1::hisG, tok1::loxP
YM 164	Δ tok1 in YM 124	MAT α	trk1::hisG, tok1::loxP

YM 165	Δ tok1 in YM 124	MATa	trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i>
YM 166	YM 124 x YM 160	MATa	trk1:: <i>hisG</i> -URA3- <i>hisG</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 167	YM 124 x YM 160	MATa	trk1:: <i>hisG</i> -URA3- <i>hisG</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 168	YM 124 x YM 160	MAT α	trk1:: <i>hisG</i> -URA3- <i>hisG</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 169	YM 124 x YM 160	MAT α	trk1:: <i>hisG</i> -URA3- <i>hisG</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 182	Δ trk2 in YM 165	MATa	trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 183	YM 166	MATa	trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 184	YM 168	MATa	trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 185	Kv1.5-pRS426-Gal1-yEGFP3 in YM 97	MATa	pRS426-GAL1 mit Kv1.5-GFP3, trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 186	Kv1.5-pRS426-Gal1-SP-yEGFP3 in YM 97	MATa	pRS426-GAL1 mit N24 Ste2-Kv1.5-GFP3, trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 187	Kv1.5-pRS426-Gal1-yEGFP3 in YM 182	MATa	pRS426-GAL1 mit Kv1.5-GFP3, trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 188	Kv1.5-pRS426-Gal1-SP-yEGFP3 in YM 182	MATa	pRS426-GAL1 mit N24 Ste2-Kv1.5-GFP3, trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 189	p423-GPD3 in YM 168	MATa	p423-GPD3, trk1:: <i>hisG</i> -URA3- <i>hisG</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 190	Kv1.5-p423-GPD3 in YM 168	MATa	p423-GPD3 mit Kv1.5, trk1:: <i>hisG</i> -URA3- <i>hisG</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 191	HERG-p423-GPD3 in YM 168	MATa	p423-GPD3 mit HERG, trk1:: <i>hisG</i> -URA3- <i>hisG</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 192	HCN2-p423-GPD3 in YM 168	MATa	p423-GPD3 mit HCN2, trk1:: <i>hisG</i> -URA3- <i>hisG</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 193	IRK1-p423-GPD3	MATa	p423-GPD3 mit IRK1, trk1:: <i>hisG</i> -URA3- <i>hisG</i> ,

	in YM 168		trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 194	p423-GPD3 in YM 182	MATa	p423-GPD3, trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 195	Kv1.5-p423-GPD3 in YM 182	MATa	p423-GPD3 mit Kv1.5, trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 196	HERG-p423-GPD3 in YM 182	MATa	p423-GPD3 mit HERG, trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 197	HCN2-p423-GPD3 in YM 182	MATa	p423-GPD3 mit HCN2, trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 198	IRK1-p423-GPD3 in YM 182	MATa	p423-GPD3 mit IRK1, trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>
YM 199	TRK1-p423-GPD3 in YM 182	MATa	p423-GPD3 mit TRK1, trk1:: <i>hisG</i> , tok1:: <i>loxP</i> , trk2:: <i>loxP</i> -KanMX- <i>loxP</i>

Klonierte Kaliumkanäle:

A)

5	systematischer Name	KCNA5
	Synonyme	Kv1.5, (HK2, HPCN1)
	Familie	spannungsgesteuerter Kaliumkanal, Shaker verwandte Subfamilie (Mitglied Nr.5), verzögerter Gleichrichter (delayed rectifier)
10	chromosomale Lokalisation	12p13.32-p13.31
	Accession	NID g4504818
	Protein	613 As, 67 kD
	Vorkommen im Gewebe	Herz, pankreatische Inseln und Insulinoma
	Homologe	mKcna5 (<i>Mus musculus</i>), 70% zu hHCN4
15	Referenzen	(Roberds, S. L. et al., 1991; Curran, M. E. et al., 1992; Snyders, D. J. et al., 1993)

B)

	systematischer Name	HCN2
20	Synonyme	BCNG2 (Brain cyclic nucleotide gated channel), HAC1

	Familie	durch Hyperpolarisation aktiviert und durch zyklische Nukleotide gesteuerter Kaliumkanal, gehört zur Superfamilie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle
	chromosomale Lokalisation	19p13.3
5	Accession	NID g4996893 g4775348
	Protein	889 As
	Funktion	Schrittmacher
	Vorkommen im Gewebe	Gehirn, Herz
	Homologe	mHcn2 (<i>Mus musculus</i>)
10	Referenzen	(Ludwig, A. et al., 1999)

C)

	systematischer Name	KCNH2
	Synonyme	HERG1 (longer splice variant)
15	Familie	spannungsgesteuerter Kaliumkanal, eag verwandte Subfamilie, Mitglied Nr.2
	chromosomale Lokalisation	7q35-q36
	Accession	NID g4557728 g4156210
	Eigenschaften	Kanalaktivierung durch K ⁺ -Kanal Regulator 1
20	beschleunigt	
	Referenzen	(Taglialatela, M. et al., 1998; Itoh, T. et al., 1998)

D)

	systematischer Name	KCNJ2 (guinea pig)
25	Synonyme	Kir2.1, IRK1
	Familie	einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal
	Vorkommen im Gewebe	Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Placenta, Skelettmuskulatur
	Referenzen	(Tang, W. et al., 1995)

30 Methoden:

PCR:

Protokoll für Powerscript Polymerase (*PAN Biotech*):

Mix für unteren Reagenzansatz (Hot Start -Protokoll) (25 μ l):

3 μ l H₂O; 2.5 μ l 10x OptiPerform™ III-Puffer, pH 9.2; 10 μ l 1.25 mM dNTP's (= 200 μ M);

1.5 μ l Primer Forward (20 pmol/ μ l); 1.5 μ l Primer Reverse (20 pmol/ μ l); 1.5 μ l 50 mM MgCl₂ (= 1.25 mM); 5 μ l 5x OptiZyme™ Enhancer.

Mix für oberes Reagenzansatz (35 μ l):

23 μ l H₂O; 3.5 μ l 10x OptiPerform™ III-Puffer; 1.5 μ l 50 mM MgCl₂; 0.5 μ l PowerScript DNA Polymerase; 7 μ l 5x OptiZyme™ Enhancer .

10 PCR-Programm (Hot-Start):

1. 94°C für 1 min
2. 94°C für 1 min
3. 50-55°C (je nach Primer) für 1.5 min
4. 69-72°C (je nach Polymerase) für 4 min
5. zurück zu 2., 27x wiederholen
6. 4°C ∞
7. Ende.

Protokoll für AmpliTaq Polymerase (*Perkin Elmer*):

20 Mix für oberes Reagenz (Hot Start -Protokoll) (50 μ l):

18.1 μ l H₂O; 4.2 μ l 10x Puffer II; 16.7 μ l dNTPs; 2.5 μ l Primer Forward; 2.5 μ l Primer Reverse; 6 μ l 25 mM MgCl₂ (= 1.5 mM).

Mix für unteres Reagenz (50 μ l):

42 μ l H₂O; 5 μ l 10x Puffer II; 1 μ l AmpliTaq Polymerase; 2 μ l Template.

25 DNA-Reinigung

Reinigung von PCR-Reaktionsansätzen: Die Reinigung von PCR-Amplifikationsprodukten erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)

30

Phenolextraktion: Probenvolumen mit TE-Puffer auf 200 μ l auffüllen. Zugabe von 200 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), mischen und 1 min bei

maximaler Drehzahl zentrifugieren. Obere Phase in neues Eppendorfgefäß überführen, Zugabe von 200 μ l Chloroform/Isoamylalkohol, mischen, 1 min zentrifugieren. Obere Phase abnehmen, anschließend Ethanolfällung.

Ethanolfällung: 5 μ l 5 M NaCl und 20 μ l 3 M NaAc (pH 5.7) zu einem Probenvolumen von ca. 200 μ l pipettieren. Das 2,5-fache Volumen an 100% Ethanol zugeben, mischen und mindestens 30 min oder länger bei -20°C lagern, bei 4°C 10 min zentrifugieren, Pellet in 170 μ l 70% kaltem Ethanol waschen, 3 min zentrifugieren und Pellet bei 37°C trocknen und in 30 μ l H_2O resuspendieren.

Reinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli*: Die Reinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Übernachtskulturen erfolgte mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol* (Qiagen)

DNA-Präparation aus *Saccharomyces cerevisiae*:

Die Hefezellen über Nacht bei 30°C in 10 ml YPD inkubieren, morgens:

Zentrifugieren für 10 min bei 3000 Rpm und Pellet in 500 μ l 1 M Sorbitol, 0.1 M

EDTA (pH 7.5) resuspendieren und in ein Eppendorftube überführen. Zugabe von 50 μ l Zymolase (5 mg/ml, in Sorbitol/EDTA) und 1 h bei 37°C inkubieren, 1 min zentrifugieren. Das Pellet in 500 μ l 50 mM Tris, 20 mM EDTA (pH 7.4)

resuspendieren. Zugabe von 50 μ l 10% SDS, gut mischen und 30 min bei 65°C inkubieren, Zugabe von 200 μ l 5 M KAc, 1 h auf Eis stellen und 10 min zentrifugieren.

Den Überstand (ca. 650 μ l) in ein neues Eppendorftube überführen und 1 Vol Isopropanol zugeben leicht mischen und 5 min stehen lassen. Entweder kurz abzentrifugieren oder ausgefallene DNA mit Glashäckchen rausziehen und Pellet lufttrocknen lassen. Das Pellet bzw. DNA in 150 μ l TE-Puffer resuspendieren, für 10 min bei 65°C lösen.

DNA-Klonierungstechniken: Sämtliche DNA-Klonierungstechniken wurden gemäß Standardprotokollen durchgeführt.

Hefetransformation (Lithium-Acetat-Methode):

Den zu transformierenden Hefestamm in 5 ml geeignetes Medium über Nacht bei 30°C auf dem Schüttler inkubieren; morgens Verdünnen der Übernachtskultur mit geeignetem Medium ($\text{OD}_{600} = 0.4-0.5$) und Inkubation für weitere 2 h auf dem Schüttler bei 30°C ($\text{OD}_{600} = 0.4-0.8$). Zentrifugation für 3 min bei 2500 rpm und Pellet

- mit 25 ml sterilem H₂O waschen, Zentrifugation für 3 min bei 2500 rpm; Pellet in 1 ml LITE (100 mM LiAc, TE pH 7.5) resuspendieren und in Eppendorfgefäß überführen. 5 min bei RT inkubieren, Zentrifugation für 15 sec (Quickspin); Pellet mit 1 ml 100 mM LiAc waschen, Quickspin; Pellet je nach Zelldichte mit 200-400 µl 100 mM LiAc resuspendieren und Aliquotieren in 50 µl-Aliquots

In der exakten Reihenfolge zugeben:

- 240 µl PEG (50%), Suspension durch sanftes Pipettieren mischen
 36 µl 1 M LiAc, Suspension durch sanftes Pipettieren mischen
 10 µl ss-sperm DNA (bei -20°C gelagert, vor Gebrauch 10 Minuten bei 80-90°C erhitzen und dann auf Eis)
- 10 2-3 µg Plasmid DNA (bzw. 8-10 µl von Miniprep, wenn Knockout-Transformation), Suspension durch sanftes Pipettieren mischen
- Transformationsansatz für 30 min bei 30°C im Überkopf-Rotator bei langsamer Drehzahl inkubieren
- 15 Transformationsansatz für 15 min bei 42°C
- Quickspin, Pellet in 200 µl TE-Puffer resuspendieren (bei Knockout: Pellet in 300 µl YPD resuspendieren und 4 h bei 30°C im Überkopf-Rotator inkubieren)
- pro Agarplatte je 100 µl (bei Knockout den gesamten Ansatz) ausplattieren und Inkubation für 3-4 d bei 30°C

20

Sequenzierung: ABI PRISM™ Red. Protokoll/AmpliTaQ®FS ¼ BigDye Terminator

Reaktionsansatz:

Premix	2 µl
DNA-Template	
SsDNA	50 ng
DsDNA	250 ng
PCR-Produkte (0.2-5 kB)	10 – 50 ng
Primer	3-10 pmol
H ₂ O bis zu Endvolumen	10 µl

- 25 Thermocycler Protokoll (25 Zyklen):

1. 96°C für 15 s
2. 96°C für 15 s
3. 55°C für 10 s
4. 60°C für 4 min
- 5 5. zurück zu 2., 24x
6. 4°C ∞
7. Ende.

Aufreinigung Reaktionsansatz (Centri Sep Spin Columns, *Princeton Separations*):

- 10 Säule mit 750 µl H₂O 30 min vorquellen; Flüssigkeit ablaufen lassen; 2 min bei 3000 rpm zentrifugieren; Reaktionsansatz mit H₂O auf 20 µl auffüllen und auf Säule geben; 2 min bei 3000 rpm zentrifugieren.

Probenauftrag: in Sequenzier tubes 4 µl Centri Sep Eluat + 20 µl TSR (Template Suppression Reagent); 2 min bei 90°C denaturieren.

15

Southern Blot:

DNA-Sonde mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdauen, mittels Gelelektrophorese auftrennen und aus dem Gel extrahieren. G genomische DNA über Nacht mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdauen und mittels Gelelektrophorese (1% Agarosegel) auftrennen

20

Gel-Vorbehandlung: Taschen des Agarosegels abtrennen. Agarosegel 15 min in 0.25 M HCl depurinieren, anschließend 2x in Aqua dest. waschen; Agarosegel 30 min in 0.5 M NaOH denaturieren; Transfer mit dem Vakuum Blotter Model 785

25

(*BioRad*): ein Fenster in die Mitte des Vinylblattes schneiden (Fensterdichtung), am Rand jeweils 0.5 cm kleiner als das Gel Nylonmembran und Filterpapier zurechtschneiden, am Rand jeweils 0.5 cm größer als das Fenster im Vinylblatt und Nylonmembran in Aqua dest. anfeuchten, anschließend Nylonmembran und Filterpapier mit Transferlösung anfeuchten

30

Aufbau der Apparatur (von unten nach oben):

Basiseinheit, Vakuumbühne, poröse Vakuumplatte, Filterpapier, Nylonmembran, Vinylfenster, Agarosegel, Abschlußrahmen, Deckel

BioRad Vakuumpumpe 10 min vorwärmen, Vakuum anlegen (5 inches Hg)

Gel am Rand leicht andrücken

Transferlösung (ca. 1 l 10x SSC) in oberes Reservoir geben; Transfer für 90 min

Vakuum ausschalten, Nylonmembran entfernen und in 2x SSC für 5 min spülen,

5 anschließend zwischen Filterpapier lufttrocknen lassen DNA-Immobilisierung:

Nylonmembran auf UV-durchlässige Klarsichtfolie legen und am Rand als positive

Kontrolle Sonde aufgeben; in den UV-Stratalinker legen und Crosslinking starten

(1200000 J \rightarrow 0); Lagerung der Membran in Klarsichtfolie oder zwischen Whatman-

Filterpapier bei Raumtemperatur bzw. 4°C möglich.

10 *Gene Images Random Prime Labelling Module (Amersham):* -

Markierung der DNA-Sonde: DNA-Sonde 5 min bei 96°C denaturieren (Hitzeschock),



danach auf Eis. 10 μ l Reaktionsmix (Nukleotidmix (5 x, Fluorescein-11-dUTP, dATP,

dCTP, dGTP und dTTP in Tris-HCl, pH 7.8, 2-Mercaptoethanol und $MgCl_2$); 5 μ l

Primer (Random Nonamers); 1 μ l Enzymlösung (Klenow-Fragment, 5 units/ml); 22 μ l

15 denaturierte DNA-Sonde; 12 μ l H_2O . 2 h bei 37°C inkubieren und 2 μ l 0.5 M EDTA

(=20 mM) zugeben, Aliquots bei -20°C lagern Überprüfung der

Markierungseffizienz: 5x Nukleotidmix mit TE-Puffer 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100,

1/250 und 1/500 verdünnen; 5 μ l DNA-Sonde mit 5 μ l 1/5-Verdünnung auf einen

Nylonmembranstreifen auftragen, kurz absorbieren lassen und 15 min bei 60°C in

20 vorgewärmten 2x SSC waschen; die restlichen Verdünnungen, ohne die 1/5-

Verdünnung auf einem Referenzmembranstreifen auftragen und beide

Membranstreifen unter UV-Licht betrachten \rightarrow Bestimmung der Probenintensität.



Hybridisierung: Nylonmembran (Blot) mit erwärmten Hybridisierungsbuffer (0.3

ml/cm²) für 2 h bei 60°C im Drehofen vorhybridisieren; Puffer abgießen, davon 10 ml

25 zurückhalten; DNA-Sonde (20 μ l) denaturieren (5 min bei 96°C, danach auf Eis

kühlen); Sonde mit den 10 ml Puffer auf den Blot geben und über Nacht im Drehofen

bei 60°C hybridisieren.

Waschschritte:

30 15 min auf Platform-Schüttler in erwärmten 1x SSC, 0.1% (w/v) SDS; 15 min auf

Platform-Schüttler in erwärmten 0.5x SSC, 0.1% (w/v) SDS

Gene Images CDP-Star Detection Module (Amersham):

Abstop- und Antikörperreaktion: Blot bei Raumtemperatur 1 h in einer 1/10 – Verdünnung Stopreagenz in Puffer A auf Schüttler inkubieren;

Antikörperlösung (an Anti-Fluorescein gekoppelte Alkalische Phosphatase, 5000x) mit 0.5% (w/v) BSA/Puffer A verdünnen, mit Blot in Folie einschweißen und bei

- 5 Raumtemperatur 1 h auf Schüttler inkubieren; ungebundene Antikörperlösung durch 3x 10 min Waschen in 0.3% Tween 20 in Puffer A entfernen

Signalerzeugung und Detektion: Waschpuffer abgießen, Blot auf Klarsichtfolie legen; 5 ml Detektionsreagenz aufgeben, 2-5 min reagieren lassen und wieder abgießen (durch die Alkalische Phosphatase kommt es zu einer Lichtproduktion); in

- 10 Klarsichtfolie einwickeln und in Dunkelkammer bei Rotlicht Film (Hyperfilm™ MP, Amersham) auflegen, 0.5-2 h in Filmkassette (BioMax, Kodak) wirken lassen, entwickeln und scannen; Blot kann bei 4°C in Klarsichtfolie gelagert werden.

- 15 Beispiel 1: Konstruktion der spezifischen Deletionskassetten

Alle Deletionen wurden nach Standardmethoden durchgeführt (Fink, G. R. et al., 1991; Wach, A. et al., 1994; Guldener, U. et al., 1996; Goldstein, A. L. et al., 1999).

Durch PCR mit den Primern TRK1-FL-BamHI-Fo, TRK1-FL-PstI-Re, TRK1-FL-PstI-

- 20 Fo und TRK1-FL-XhoI-Re für TRK1, bzw. TRK2-DEL-5-Fo-B, TRK2-DEL-5-Re, TRK2-DEL-3-Fo und TRK2-DEL-3-Re für TRK2, sowie TOK1-DEL-5-Fo, TOK1-DEL-5-Re, TOK1-DEL-3-Fo und TOK1-DEL-3-Re für TOK1, wurde je ein etwa 500 bp

langes Fragment amplifiziert, das jeweils die Anfangs- bzw. Endregion des Gens darstellt (s. Kapitel 2.3). Die amplifizierten Enden ermöglichen später eine richtige

- 25 Integration in das Hefegenom. Als DNA-Template diente der Hefestamm *w303 a/a* bzw. *w303 a/a Δ trk1*.

Beispiel 2: Konstruktion der Einfach-, Doppel- und Dreifach-Mutanten

30

Beispiel 2 a: Einfach-Knockout

Die konstruierten Deletionskassetten für TRK1, TRK2 und TOK1 wurden jeweils in den diploiden Hefestamm YM 96 (MATa/MATα) transformiert. Durch Wachstum der

trk1-Mutanten (YM123/124) auf (-)URA/Glc und der *trk2*- (YM158-161) bzw. *tok1*-Mutanten (YM154-157) auf YPD/Geneticin wurde überprüft, ob die Deletionskassetten im Genom integriert waren, da der URA3-Marker in der TRK1-Deletionskassette ein Wachstum auf (-)URA-Medium ermöglicht, der KAN-Marker in der TRK2- bzw. TOK1-Deletionskassette ein Wachstum auf Geneticin (Fink, G. R. et al., 1991).

Durch Replikaplattierung wurden die positiven Kolonien auf eine Sporulationsplatte übertragen, worauf die Sporulation von MATa/MAT α diploiden Zellen nach 18-24 h ohne vegetatives Wachstum erfolgt. Nach Zymolasebehandlung und erneutem Wachstum auf YPD wurden dann mit Hilfe des Dissektionsmikroskops von einigen Kolonien Tetraden in je 4 Sporen vereinzelt.

Die Bestimmung des Matingtyps der Sporenkolonien erfolgte durch Paarung mit den entsprechenden Testerstämmen (Fink, G. R. et al., 1991). Die Selektion für Vorhandensein der deletionskassette erfolgte durch replika-Plattierung auf -URA Medium (für *trk1*) bzw. auf Geneticin -enthaltendem Medium für *trk2* und *tok1*. Nach Gewinnung der genomischen DNA der Transformanten durch Hefe-DNA Präparation, wurde das Ergebnis durch diagnostische PCR und Southern Blot bestätigt.

Beispiel 2 b: Doppel-Knockout

Die TOK1-Deletionskassette wurde in die haploiden $\Delta trk1$ -Hefestämme YM123 und YM124 transformiert und durch Wachstum auf YPD/Geneticin auf Integration der TOK1-Deletionskassette selektiert. Das Ergebnis wurde mit diagnostischer PCR und Southern Blot überprüft. Von den (+)URA3,(+)KAN ($\Delta trk1 \Delta tok1$)-Stämmen wurden Glycerinkulturen angelegt (YM140, YM141, YM143 und YM144).

Einzelkolonien wurden als Patches ausgestrichen, auf 5-FOA replikaplatziert und Kolonien selektioniert, die den URA3-Marker und ein *hisG*-Repeat aus der TRK1-Deletionskassette eliminiert hatten (Fink, G. R. et al., 1991). Auf (-)URA/Glc wuchsen demnach keine Kolonien, da das URA3-Gen (in TRK1) zur Uracilsynthese fehlte, auf YPD/Gen dagegen überlebten alle Kolonien, durch das Resistenzgen in der TOK1-Deletionskassette.

Um den Kan-Marker aus dem Genom zu entfernen, wurden die (-)URA3-Mutanten mit dem Plasmid pSH47 transformiert, auf dem sich die Gene für Cre-Rekombinase und Uracilsynthese (URA3) befinden. Positive Transformanten wuchsen auf (-)URA/Glc, durch Inkubation in (-)URA/Gal-Flüssigmedium konnte dann die Cre-Rekombinase induziert werden. Dabei wird der Kan-Marker mit einem *loxP*-Repeat eliminiert, zurück bleibt ein *loxP*.

Nach Einstellung der Übernachtskultur auf eine $OD_{600} = 5$ wurden die Verdünnungen 1:10000 und 1:50000 auf (-)URA/Gal ausplattiert. Patches von Einzelkolonien, auf YPD/Gen replikaplattiert, zeigten kein Wachstum (das heißt der Kan-Marker wurde erfolgreich eliminiert). Um das Plasmid pSH47 wieder zu entfernen, wurde anschließend erneut 2x auf 5-FOA selektioniert. Von den (-)URA(-)KAN ($\Delta trk1 \Delta tok1$)-Stämmen wurden Glycerinkulturen angelegt (YM162, YM163 und YM164).

Beispiel 2 c: Dreifach-Knockout

Von $\Delta trk1 \Delta tok1$ -Einzelkolonien (YM162 und YM164) wurden Übernachtskulturen in YPD angesetzt, am nächsten Tag mit der *BsWI/Spel* verdauten TRK2-Deletionskassette transformiert und auf YPD/KCl/Geneticin ausplattiert. Nach einer Hefe-DNA-Präparation wurde der Dreifach-Knockout durch diagnostische PCR und Southern Blot bestätigt.

Reihe oben von links nach rechts:	Reihe unten von links nach rechts:
1. Marker	1. Marker
2. YM 97 mit TRK1 DiaFo/Re1	2. YM 182 mit TRK1 DiaFo/Re1
3. YM 97 mit TRK2 DiaFo/Re1	3. YM 182 mit TRK2 DiaFo/Re1
4. YM 97 mit TOK1 DiaFo/Re1	4. YM 182 mit TOK1 DiaFo/Re1
5. YM 97 mit TRK1 DiaFo/URARE	5. YM 182 mit TRK1 DiaFo/URARE
6. YM 97 mit TRK2 DiaFo/KANRe	6. YM 182 mit TRK2 DiaFo/KANRe
7. YM 97 mit TOK1 DiaFo/KANRe	7. YM 182 mit TOK1 DiaFo/KANRe
8. frei	8. frei
9. YM 97 mit TRK1 DiaFo/Re2	9. YM 182 mit TRK1 DiaFo/Re2
10. YM 97 mit TRK2 DiaFo/Re2	10. YM 182 mit TRK2 DiaFo/Re2
11. YM 97 mit TOK1 DiaFo/Re2	11. YM 182 mit TOK1 DiaFo/Re2

Beispiel 3: Subklonierung und Transformation der humanen Kaliumkanäle in die Doppel- bzw. Dreifachmutante

Die humanen Gene HERG, HCN2, Kv1.5, sowie als Positivkontrollen TRK1 und
 5 IRK1 (Meerschweinchen), wurden mittels Restriktionsverdau aus den
 Trägerplasmiden (HERG zwischen *Bam*HI in pcDNA; HCN2 zwischen *Nco*I/*Xho*I in
 pTLN; Kv1.5 zwischen *Nhe*I/*Eco*RI in pcDNA3.1(-); IRK1 zwischen *Bam*HI/*Eco*RI in
 pSGEM) ausgeschnitten, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel
 extrahiert. Jeder humane Kaliumkanal wurde einzeln in den Hefevektor p423-GPD3
 10 (Mumberg, D. et al., 1995; Ronicke, V. et al., 1997) ligiert und in *E.coli* transformiert.
 Durch Kontrollverdau der Plasmid-Präparationen und Sequenzierung konnte
 festgestellt werden, welche der Klone das humane Gen integriert hatten. Die
 Plasmide wurden anschließend in den $\Delta trk1 \Delta trk2$ Doppel-Knockout (YM 168) und in
 den $\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$ Dreifach-Knockout (YM 182) transformiert, und auf (-)HIS/80
 15 mM KCl ausplattiert.

Beispiel 4: Charakterisierung der Knockout-Stämme

20 Beispiel 4 a: Wachstum der Doppel- und Dreifach-Mutanten bei verschiedenen
 K⁺-Konzentrationen und pH-Werten auf Kulturplatten

Zum Vergleich des unterschiedlichen Kaliumbedarfs der verschiedenen Knockouts
 wurden die Hefestämme YM 182, YM 168, und YM 97 (WT) auf DPM-Platten mit
 25 unterschiedlichen K⁺-Konzentrationen und unterschiedlichen pH-Werten inkubiert.
 Dazu wurden von den Glycerinkulturen zuerst Patches auf 100 mM KCl/pH 6.5
 ausgestrichen. Nach 2 Tagen Wachstum wurde auf 50 mM, 30 mM, und 5 mM KCl
 replikaplattiert.

Dieser Versuch zeigte, daß sowohl der Stamm YM168 ($\Delta trk1 \Delta trk2$), als auch der
 30 Stamm YM182 ($\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$) auf 50 mM und 30 mM KCl lebensfähig ist.
 Zusätzlich zeigte sich, daß der Stamm YM182 in Gegenwart von 30 mM KCl besser
 wuchs als der Stamm YM168. In Gegenwart von 5 mM KCl waren beide Stämme im
 Gegensatz zum Wildtyp-Stamm YM97 nicht überlebensfähig.

Zum Test auf pH-Abhängigkeit wurden die drei Stämme zusätzlich auf 100 mM bzw. 5 mM KCl/pH 5.0 und auf 100 mM bzw. 5 mM KCl/pH 4.0 replikaplatziert. Dieser Versuch zeigte, daß sowohl YM168 als auch YM182 bei pH4.0 in Gegenwart von 100 mM KCl und 5 mM KCl nicht überlebensfähig sind. Bei pH5.0 und 100 mM KCl ist der Wachstumsdefekt von YM168 stärker ausgeprägt als bei Stamm YM182. Der Wachstumsdefekt der Stämme YM168 ($\Delta trk1 \Delta trk2$) und YM182 ($\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$) wird durch Expression von TRK1 vom Vektor pRS416GAL1 völlig kompensiert.

10

Beispiel 4 b: Wachstum von Doppel- und Dreifach-Mutante bei verschiedenen K^+ -Konzentrationen in Flüssigmedium



Zur Charakterisierung der Stämme YM168 ($\Delta trk1 \Delta trk2$) und YM182 ($\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$), auf denen alle weiteren Versuche basieren, wurde das Wachstumsverhalten der Hefestämme in Flüssigkultur untersucht. Zunächst wurden Über-Nacht-Kulturen in DPM/80 mM KCl angesetzt und am nächsten Morgen mit DPM/5 mM KCl sowie mit DPM/15 mM KCl auf eine OD = 0.05 eingestellt. In definierten Zeitabständen wurde mit Hilfe eines Photometers die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt.

20

Diese Untersuchungen zeigen, daß der Wachstumsdefekt des Stammes YM182 bei 5 mM KCl und bei 15 mM KCl weniger stark ausgeprägt ist als bei Stamm YM168.



Beispiel 5: Charakterisierung der humanen Kaliumkanäle in Doppel- und Dreifach-Knockout

Beispiel 5 a: Komplementationsvermögen bei K^+ -Mangel auf Kultur-Platten

Die Stämme YM168 ($\Delta trk1 \Delta trk2$) und YM182 ($\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$) wurden jeweils mit den humanen Kaliumkanälen Kv1.5 ((Fedida, D. et al., 1998); YM190 bzw. YM195) und HERG1 ((Fedida, D. et al., 1998); YM191 bzw. YM196) in p423-GPD3 als Hefeexpression-Vektor transformiert. Als Positivkontrolle dienten gplRK1 ((Tang, W. et al., 1995); YM193 bzw. YM198) in p423-GPD3 als Hefeexpression-Vektor

(Mumberg, D. et al., 1995; Ronicke, V. et al., 1997). Der leere Vektor p423-GPD3 (YM189 bzw. YM194) diente als Negativkontrolle. Die transformierten Hefestämme wurden auf (-)HIS/80 mM KCl-Medium ausplattiert. Danach wurden Patches von Einzelkolonien auf DPM/5 mM KCl (pH 6.5) replikaplattiert, um die Fähigkeit zur

5 Komplementation des Kaliummangels zu überprüfen.

Diese Versuche zeigten, daß die Positivkontrolle gplRK1 (YM193 bzw. YM198) in p423-GPD3 den Wachstumsdefekt von Doppel- und Dreifach-Knockout vollständig komplementiert. Der leere Vektor p423-GPD3 (YM189 bzw. YM194) als

Negativkontrolle ist nicht in der Lage, den Wachstumsdefekt zu komplementieren.

10 Der humane Kaliumkanal Kv1.5 komplementiert den Wachstumsdefekt von Doppel- und Dreifach-Knockout zwar, jedoch signifikant schlechter als die Positivkontrolle gplRK1. Zudem war die Komplementation in der $\Delta trk1 \Delta trk2$ -Mutante deutlich

schlechter als in der $\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$ -Mutante. Unter den gegebenen

Versuchsbedingungen komplementiert der HERG1-Kanal den wachstumsdefekt von

15 Doppel- und Dreifach-Knockout nicht.

Beispiel 5 b: Wachstum in Gegenwart von Aktivatoren auf Kultur-Platten

20 Um den Einfluß von Aktivatoren auf die verschiedenen Kaliumkanäle zu verdeutlichen, wurden die oben angeführten Stämme in Medien inkubiert, die folgende spezifische Aktivatoren enthielten.

Kv1.5: Rb^+ verlängert die Hyperpolarisationsphase. Dies bedeutet, daß der nach innen gerichtete K^+ -Strom länger anhält und die Möglichkeit zur Komplementation
25 des Wachstumsdefekts erhöht.

HERG: Cs^+ verlängert die Hyperpolarisationsphase. Dies bedeutet, daß der nach innen gerichtete K^+ -Strom länger anhält und die Möglichkeit zur Komplementation des Wachstumsdefekts erhöht. Dieser kanal wird durch Cs^+ inhibiert.

IRK1: Cs^+ blockiert diesen Kanal.

30 Die Versuche für p423-GPD3-Kv1.5 zeigten, daß der humane Kv1.5 -Kanal in der Gegenwart von 2 mM RbCl in der Lage ist, den Wachstumsdefekt der $\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$ -Mutante vollständig zu komplementieren (Fig. 3). Die Komplementation des

Wachstumsdefekt der $\Delta trk1 \Delta trk2$ -Mutante ist deutlich schlechter (Fig. 3). Dies stimmt überein mit den unter Beispiel 6 a dargestellten Ergebnissen.

- 5 Die Versuche für p423-GPD3-HERG zeigten, daß der humane HERG1 -Kanal in der Gegenwart von 2 mM CsCl in der Lage ist, den Wachstumsdefekt der $\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$ -Mutante vollständig zu komplementieren (Fig. 4). Die Komplementation des Wachstumsdefekt der $\Delta trk1 \Delta trk2$ -Mutante ist deutlich schlechter (Fig. 4). Dies stimmt überein mit den unter Beispiel 6a dargestellten Ergebnissen.

10

Beispiel 5 c: Komplementation durch den Kv1.5 -Kanals in der $\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$ -Mutante in Gegenwart von RbCl in Flüssigmedium

- 15 Die Hefestämme YM 194 und YM 195 wurden in DPM/-HIS/5 mM KCl mit 1 mM RbCl auf ihr unterschiedliches Wachstumsverhalten in Flüssigmedium hin überprüft. Hierzu wurden 10 ml Über-Nacht-Kultur in DPM/-HIS/80 mM KCl angesetzt und am nächsten Morgen mit den entsprechenden Medien auf eine $OD_{600} = 0.05$ eingestellt (20 ml Endvolumen). In definierten Zeitabständen wurde mit Hilfe eines Photometers
20 die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt.

Diese Versuche belegen eindeutig, daß die Expression von KV1.5 vom Vektor p423-GPD3 in einem Hefestamm, der für TRK1, TRK2 und TOK1 deletiert ist, den dadurch entstehenden Wachstumsdefekt komplementieren kann.

- 25 In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Komplementation des Wachstumsdefekts durch Kv1.5, und ebenfalls von gpIRK1, in der Gegenwart von 2 mM CsCl inhibiert wird.

- 30 Beispiel 5 d: Komplementation durch den HERG -Kanals in der $\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$ -Mutante in Gegenwart von CsCl in Flüssigmedium

Die Hefestämme YM 194 und YM 196 wurden in DPM/-HIS/5 mM KCl mit 1 mM CsCl auf ihr unterschiedliches Wachstumsverhalten in Flüssigmedium hin überprüft.

Hierzu wurden 10 ml Über-Nacht-Kultur in DPM/-HIS/80 mM KCl angesetzt und am nächsten Morgen mit den entsprechenden Medien auf eine $OD_{600} = 0.05$ eingestellt (20 ml Endvolumen). In definierten Zeitabständen wurde mit Hilfe eines Photometers die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Diese Versuche belegen eindeutig, daß

5 die Expression von HERG1 vom Vektor p423-GPD3 in einem Hefestamm, der für TRK1, TRK2 und TOK1 deletiert ist, den dadurch entstehenden Wachstumsdefekt komplementieren kann.

Literatur

10

Curran, M. E., Landes, G. M., and Keating, M. T. Molecular cloning, characterization, and genomic localization of a human potassium channel gene. *Genomics* 12: 729 - 737. (1992)

15

Dascal, N., Schreibmayer, W., Lim, N. F., Wang, W., Chavkin, C., DiMagno, L., Labarca, C., Kieffer, B. L., Gaveriaux-Ruff, C., and Trollinger, D. Atrial G protein-activated K^+ channel: expression cloning and molecular properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90: 10235 - 10239. (1993)

Fairman, C., Zhou, X., and Kung, C. Potassium uptake through the TOK1 K^+ channel in the budding yeast. *J.Membr.Biol.* 168: 149 - 157. (1999)

20

Fedida, D., Chen, F. S., and Zhang, X. The 1997 Stevenson Award Lecture. Cardiac K^+ channel gating: cloned delayed rectifier mechanisms and drug modulation. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 76: 77 - 89. (1998)

Fink, G. R. and Guthrie, C. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Guthrie, C. and Fink, G. R. (1994). 1991. Academic Presss, Inc. Methods in Enzymology.

25

Ref Type: Book, Whole

Gaber, R. F., Styles, C. A., and Fink, G. R. TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 8: 2848 - 2859. (1988)

- Goldstein, A. L. and McCusker, J. H. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *saccharomyces cerevisiae* [In Process Citation] *Yeast*. 15: 1541 - 1553. (1999)
- 5 Goldstein, S. A., Price, L. A., Rosenthal, D. N., and Pausch, M. H. ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae* [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jan 5;96(1):318] *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93: 13256 - 13261. (1996)
- 10 Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J. H. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic.Acids.Res.* 24: 2519 - 2524. (1996)
- 15 Ikeda, K., Kobayashi, K., Kobayashi, T., Ichikawa, T., Kumanishi, T., Kishida, H., Yano, R., and Manabe, T. Functional coupling of the nociceptin/orphanin FQ receptor with the G- protein-activated K⁺ (GIRK) channel. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 45: 117 - 126. (1997)
- Itoh, T., Tanaka, T., Nagai, R., Kamiya, T., Sawayama, T., Nakayama, T., Tomoike, H., Sakurada, H., Yazaki, Y., and Nakamura, Y. Genomic organization and mutational analysis of HERG, a gene responsible for familial long QT syndrome. *Hum.Genet.* 102: 435 - 439. (1998)
- 20 Jan, L. Y. and Jan, Y. N. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu.Rev.Neurosci.* 20:91-123: 91 - 123. (1997)
- Jelacic, T. M., Sims, S. M., and Clapham, D. E. Functional expression and characterization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels containing GIRK3. *J.Membr.Biol.* 169: 123 - 129. (1999)
- 25 Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., and Goldstein, S. A. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376: 690 - 695. (1995)
- Ko, C. H., Buckley, A. M., and Gaber, R. F. TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125: 305 - 312. (1990)

- Ko, C. H. and Gaber, R. F. TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 11: 4266 - 4273. (1991)
- Kubo, Y., Reuveny, E., Slesinger, P. A., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel
5 [see comments] *Nature* 364: 802 - 806. (1993)
- Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F., and Biel, M. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* 18: 2323 - 2329. (1999)
- Madrid, R., Gomez, M. J., Ramos, J., and Rodriguez-Navarro, A. Ectopic potassium
10 uptake in trk1 trk2 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* 273: 14838 - 14844. (1998)
- Main, M. J., Brown, J., Brown, S., Fraser, N. J., and Foord, S. M. The CGRP receptor can couple via pertussis toxin sensitive and insensitive G proteins. *FEBS Lett.* 441: 6 - 10. (1998)
- 15 Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156: 119 - 122. (1995)
- Myers, A. M., Pape, L. K., and Tzagoloff, A. Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 4: 2087 - 2092. (1985)
- 20 Nakamura, R. L., Anderson, J. A., and Gaber, R. F. Determination of key structural requirements of a K⁺ channel pore. *J. Biol. Chem.* 272: 1011 - 1018. (1997)
- Roberds, S. L. and Tamkun, M. M. Cloning and tissue-specific expression of five voltage-gated potassium channel cDNAs expressed in rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 1798 - 1802. (1991)
- 25 Ronicke, V., Graulich, W., Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. Use of conditional promoters for expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 283:313-22: 313 - 322. (1997)

- Sanguinetti, M. C. and Zou, A. Molecular physiology of cardiac delayed rectifier K⁺ channels. *Heart Vessels Suppl* 12: 170 - 172. (1997)
- Schreibmayer, W., Dessauer, C. W., Vorobiov, D., Gilman, A. G., Lester, H. A., Davidson, N., and Dascal, N. Inhibition of an inwardly rectifying K⁺ channel by G-protein alpha- subunits. *Nature* 380: 624 - 627. (1996)
- Smith, F. W., Ealing, P. M., Hawkesford, M. J., and Clarkson, D. T. Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92: 9373 - 9377. (1995)
- Snyders, D. J., Tamkun, M. M., and Bennett, P. B. A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J.Gen.Physiol.* 101: 513 - 543. (1993)
- Taglialatela, M., Castaldo, P., Pannaccione, A., Giorgio, G., and Annunziato, L. Human ether-a-gogo related gene (HERG) K⁺ channels as pharmacological targets: present and future implications. *Biochem.Pharmacol.* 55: 1741 - 1746. (1998)
- Tang, W., Ruknudin, A., Yang, W. P., Shaw, S. Y., Knickerbocker, A., and Kurtz, S. Functional expression of a vertebrate inwardly rectifying K⁺ channel in yeast. *Mol.Biol.Cell* 6: 1231 - 1240. (1995)
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 10: 1793 - 1808. (1994)
- Wang, Q., Chen, Q., and Towbin, J. A. Genetics, molecular mechanisms and management of long QT syndrome. *Ann.Med.* 30: 58 - 65. (1998)
- Wilde, A. A. and Veldkamp, M. W. Ion channels, the QT interval, and arrhythmias. *Pacing.Clin.Electrophysiol.* 20: 2048 - 2051. (1997)
- Wischmeyer, E., Doring, F., Spauschus, A., Thomzig, A., Veh, R., and Karschin, A. Subunit interactions in the assembly of neuronal Kir3.0 inwardly rectifying K⁺ channels. *Mol.Cell Neurosci.* 9: 194 - 206. (1997)

Yamada, M., Inanobe, A., and Kurachi, Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol.Rev.* 50: 723 - 760. (1998)

Tabelle 1: SEQ ID. NO. 1

Nukleotidsequenz von TRK1

```

5  ATGCATTTT TAGAAGAACGATGAGTAGAGTGCCACATTGGCATCTCTTGAAATACGATATAAAAAATCTTTCGGC
   CATAAATTTTCGTGATTTTATTGCTCTATGTGGTCACTATTTTGCTCCAGTTAAAAAATATATCTTCCCCAGTTTT
   ATCGCGGTTCACTACTTCTACACGATATCCCTGACATTAATAACTTCAATCCTGCTATATCCCATTAAGAATACC
   AGATACATTGATACATTGTTTTTAGCAGCGGGCGCAGTTACACAAGGTGGCTTAAATACTGTGGATATCAACAAT
   CTAAGCTTATACCAACAAATTGTTCTGTATATCGTATGCTGCATATCAACACCAATTGCAGTTCATAGTTGCTTG
10 GCATTTGTACGGCTTTACTGGTTTGAGCGCTACTTCGATGGTATTAGAGACTCTTCTAGACGAAATTTTAAAGATG
   AGAAGAACGAAAAACAATCTTAGAAAAGGGAACTAACAGCAAGAACCATGACCAAGAATAGAACAGGTACCCAAAGA
   ACGTCTTATCCTAGGAAACAAGCTAAAAACAGATGATTTCCAAGAAAAATTGTTTCAGCGGAGAAAATGGTTAATAGA
   GATGAGCAGGACTCAGTTCACAGCGACCAGAATTCTCATGACATTAGTAGGGACAGCAGCAATAATAATACGAAT
   CACAATGGTAGCAGTGGCAGTTTAGATGATTTTCGTTAAGGAAGACGAAACGGATGACAATGGAGAATATCAGGAG
15 AACAACCTCTACTCGACGGTAGGTAGTTTCGTCTAACACAGTTGCAGACGAAAGTTTAAATCAGAAGCCCCAAGCCA
   AGCAGTCTTCGGTTTTGATGAGCCACACAGCAAAACAAAGACCCGCAAGAGTTCCCTCAGAGAAAATTTGCAAAAAGA
   AGGGGTTCAAGAGATATTAGCCCAGCCGATATGTATCGATCCATTATGATGCTACAAGGTAAGCATGAAGCAACT
   GCTGAAGATGAAGTCCCCCTTTAGTCATCGGGTCCCCTGCGGATGGCACAAGATATAAAAGTAATGTCAATAAG
   CTAAGAAGGCCACCGGCATAAATGGTAACAAAATCAAGATTCGAGATAAGGGAAATGAAAGTAACACTGATCAA
20 AATTCCGTGTCAAGTGAAGCAACAGTACGGCGAGCGTTTCGGACGAAAGCTCGTTACACACAAAATTTTGGTAAC
   AAAGTACCTTCATTAAGAACAAATACTCATAGATCAAATTCGGGCCCGATAGCCATTACTGATAACGCAGAAACA
   GACAAAAGCATGGGCCATCAATTCAATTCGATATAACTAAACCTCCTAGAAAAATTTCAAAAAGAGTTTCAACC
   TTCGATGATTTGAACCCAAAATCTTCCGTTCTTTATCGAAAAAAGCATCGAAGAAGTACCTCATGAAACATTTT
   CCTAAAGCGCGGCGAATACGGCAACAAATTAAGAGAAGGCTTTCTACTGGTTCAATTGAGAAAAACAGCAGTAAC
25 AATGTTTCAGATAGAAAACCTATTACTGATATGGATGATGATGATGATGACGATGACAACGACGGCGATAACAAC
   GAAGAATACTTTGCTGACAACGAAAGCGGCGATGAAGATGAACGAGTACAGCAGTCTGAACCACATTCTGATTCA
   GAACTCAAATCGCACCAACAACAGCAAGAAAAACCAACTGCAGCAGAACCTGCACCGCATGTATAAAACCAA
   TCATTTGATGATAATCGTTCAAGAGCAGTTCCTATGGAACGTTCCAGGACCATCGATATGGCAGAGGCTAAGGAT
   CTAAATGAGCTCGCAAGGACGCTGATTTTCAAAAAATGGTCTATCAAATTTGGAAAGCCCATCATAGAAAAAAA
30 CCGAACTTTAGGAAGAGGGGATGGAATAACAAGATATTTGAACATGGTCCCTATGCATCTGACAGCGATCGCAAT
   TATCCTGATAATAGTAATACTGGAAACAGTATTCTTCATTACGCAGAGTCTATTTTACATCATGATGGCTCTCAT
   AAAAATGGAAGCGAAGAAGCCTCTTCCGACTCTAATGAGAATATCTATTCCACGAATGGAGGAAGCGACCACAAT
   GGTCTTAACAACATCTCTACTTACAACGACGATGAAGAAGGCTATTATGGTTTACATTTGATACCGATTATGAC
   CTAGATCCTCGTCATGATTTATCTAAAGGCAGTGGTAAAACGTATCTATCATGGCAACCAACTATTGGACGTAAC
35 TCAAACCTCCTTGGATTAACAAGAGCCCAGAAAGATGAATTAGGTGGTGTGAGTACAGAGCAATCAAACTTTTA
   TGCACCATTATTGGTTGTCTACTACGTTGGATGGCATAATTGTTGCTTTTGTATGTTAGTACCTTGGATTATTTTG
   AAAAAAGAGTTTATAGTGAAGTTGTTAGAGATGATGGTGTTCACCTACATGGTGGGGATTTTGGACAGCAATGAGT
   GCATTTAATGATTTAGGTTTGACATTAACCTCAAATTCATGATGTCGTTTAAACAAAGCTGTATACCCATTGATC
   GTTATGATTTGGTTTATCATTATCGGAAATACAGGGTTTCCCATCCTTCTTAGATGCATCATTGGGATAATGTTT
40 AAAATTTCTCCTGATTTATCACAGATGAGAGAAAGTTTAGGTTTTCTCTTAGACCATCCACGTCGTTGTTTCACC
   TTGCTATTTCTTAAGGCAGCTACATGGTGGCTACTTTTAACGCTTGCAGGATTGAATATAACTGATTGGATTTTA
   TTTATTATTCTAGATTTTGGCTCAACAGTTGTGAAATCATTATCGAAAGGCTATAGAGTCCTTGTTCGGCTGTTT
   CAATCTGTTAGCACAAGAAGCTGCTGGATTTCAGCGTTGTCGATTTAAGTCAACTGCATCCTTCTATCCAAGTCTCC
   TATATGCTAATGATGTATGTCTCCGTATTACCATTTGGCCATCTCTATTTCGACGGACAAATGTTTACGAGGAGCAA
45 TCTTTAGGACTATATGGAGATATGGGGGAGAACAGAGATACGGATACTGAAGACGATGGTAACGATGAAGAT
   GACGACGAGGAAAACGAGAGTCACGAAGGTCAAAGTAGTCAAAGAAGTAGTTTCAACAACAACAACAATAACAAC
   AGGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAACTGAAAATCCAAATGAAATATCTACAAAATCCTTTATCGGTGCCCATTTA
   AGGAAACAGCTTTTCAATTTGACTTGTGGTTTCTATTTTTAGGGTTATTTATCATTTGCATTTGTGAAGGGGACAAG
   ATAAAGGACGTACAAGAACCAAACTTAAATATATTGCAATTCCTTTTGAAATTGTTAGCGCTTACGGTACAGTT
50 GGGCTATCGCTAGGTTATCCGGACACCAACCAATCGTTTTCAAGACAGTTTACTACATTATCTAAGTTGGTGATC
   ATAGCTATGCTGATCAGAGGCAAGAATAGAGGTCTACCATACTCACTGGATCGTGCAATTATCTTGCTAGTGAT
   AGACTTGAACATATTGACCACCTTGAGGGCATGAAATTGAAGAGACAGGCTAGAACCAATACAGAAGACCCAATG
   ACGGAACATTTCAAGAGAAGTTTCACTGATGTGAACATCGTTGGGGAGCTCTTAAGCGTAAGACCACACATTCC
   CGAAATCCTAAAAGGAGCAGCACACGCTCTAA

```

Tabelle 2: SEQ ID. NO. 2

Nukleotidsequenz von TRK2

5 ATGCCAACAGCTAAGAGGACGTCATCCAGGGCTTCGTTGGCACTGCCCTTCCAGTTACGGTTGGTGCACAAGAAA
 TCATGGGGCCATCGGCTAAGAGACTTCATTTCCGGGTTCCTAAATCATGCAGACCCATTGCTAAATACGTTTTC
 CCCAACTTCATCGTGGTGCATATATCTACCTGATCACGCTGTCGATTATCGGGTCCATTCTGTTATATCCGTGC
 AAGAACACGGCGTTTCATCGATGTGCTATTTCTGGCTGCTGGAGCGTCTACACAGGGCGGGCTGGCCACCAAGAGC
 ACTAACGATTTCAACCTGTACCAGCAGATAGTGGTGACGTCATTACATTGCTGTCCACGCCCTATACTTATTCAT
 10 GGGTTTTTGGCCTTTGTGAGGCTGTATTGGTTTGAAGGTACTTCGACAACATTAGGGATATCTCCAAACAGAAT
 TTTAAACTAAGAAGGACCATGACGTTGCAACAAAGGGAATATCGGGCAGCAGTGGCAATGCCGCTCGAAGTAGG
 AGTTTCAAGGACAACCTGTTCCGTGGGAAGTTTGTTCAGAGAAGACCCACGACAATCCGCTTCAGATGTGCCG
 ATGGACTCTCCTGACACGTCCGCATTGTCTCAATCTCACCCTTGAATGTTTCTCCTCTAAGGAGGAATCCAGT
 GACACGCAAAGCTCGCCTCCAACTTCTCAAGTAAGCGCCAACCTCAGACGTTGACCCAAGAGACATTTACAAA
 TCGATAATGATGCTACAAAAACAACAAGAGAAGAGCAACGCAAACCTCCACGGATTCTTTTTCGAGCGAGACCAAT
 15 GGACCCGCTTTCATTGTGACGGAACGTGATGAGAGAAGAGCCCCCACTGCTCACTGAAACGCCATTCTGTCTCTG
 CCATCTTCTCAGGAATTGAACAAGCTAGCCAGACGAAAAGTTTCCAGAAATTGCTTGGCTTGGGAGAGATGAA
 GGTGACCATGACTACTTTGACGGTGCTCCTCACAAATATATGGTCAACCAAGAAGAAAAAATATCTAGAACGCAA
 TCATGTAACATCCCAACGTATACTGCTTCACCGAGTCTTAAACCTCAGGCCAAGTAGTTGAAAATCATAGAAAC
 TTGGCCAAGTCGGCGCCTTCATCTTTTGTGATGAGGAGATGAGCTTTTACCAGCAAGAGTCTTTGAATTTACAG
 20 TTCCAAGCGCACCCGCCAAACCAAAACGACGTGAAGGTGATATAGGCCACCCCTTACCAGAACAATGAGCACC
 AACTATCTATCGTGGCAGCCAACCTTTGGCAGAACTCCGTCTTCATTGGACTCACAAAGCAACAAAAGGAGGAA
 CTCGGCGGTGTGCAATATCGTGCTTTGAGATTGCTGTGCTGCATTCTCATGGTATACTACATCGGATTCAACATT
 TTGGCGTTTGTGACCATCGTTCCATGGGCCTGTACGAGGCACCACTACTCAGAGATTATTAGACGAAATGGAGTT
 TCTCCAACCTGGTGGGGTTTTCTACTGCAATGAGTGCATTGAGCAACTTGGGTCTGTCTTTGACCGCTGATTCA
 25 ATGGTTTCCCTTTGATGACTGCGCGGTATCCGCTGATTTTCATGATGTTCTTCATCATCATAGGCAATACAGGCTTC
 CCAATTATGTTACGATTTATCATTTTGGATCATGTTCAAGACCTCGAGAGACCTATCTCAGTTTAAGGAAAGTCTT
 GGGTTTCTCTTGGATCATCCGCGCAGGTGTTTACGTTGCTGTTCCTCCAGCGGCCCCACATGGTGGCTGTTTACA
 ACTTTAGTCGTCTTAAACGCTACGGATTGGATTCTTTTCATAATTCTGGATTTCAACTCCGCTGTAGTAAGGCAG
 GTTGCTAAAGGTTATCGAGCTCTCATGGGCCTCTTCCAGTCTGTATGCACAAGAACTGCTGGATTCAACGTTGTT
 30 GACTTAAGTAAATTACACCCGTCCATTTCAGGTGTCTTATATGCTAATGATGTACGTTTCGGTCTGCCGCTGGCG
 ATTTCCATTAGAAGAACGAATGTTTATGAGGAGCAATCGTTGGGACTATACGATAGTGGACAAGATGACGAAAAAT
 ATCACCACGAAGACGATATAAAGGAAACAGACCATGATGGCGAATCCGAAGAGCGAGACACTGTATCTACAAAG
 TCCAAGCCGAAGAAACAGTCCCCAAAATCGTTTGTGGTGCTCATTTGAGGAGGCAACTCTCTTTTGATTATG
 35 TACCTATTCCCTTGGATTATTTATAATATGCATATGCGAGGGCAGAAAAATCGAAGACGTTAATAAACCTGATTT
 AATGTCTTTGCTATATTGTTTGAAGTTGTTAGCGCTTATGGTACAGTGGGTTTGTGATTGGGTTTACCAAAACACC
 AACACATCACTATCTGCCAGTTCACCGTATTATCGAAGCTAGTCATAATTGCCATGCTAATAAGAGGAAGAAAT
 AGAGGTTTACCATACTTTGGATCGTGCCATCATGCTGCCAAGTGACAACTGGAACAAATTGATCGTTTACAA
 GATATGAAAGCTAAGGGTAAGTTGTTAGCCAAAGTTGGTGAGGATCCAATGACTACTTACGTCAAAAAGAGATCC
 40 CACAACTGAAAAAATAGCAACAAAGTTTTGGGGGAAGCATTA

Tabelle 3: SEQ ID NO. 3

Nukleotidsequenz von TOK1

45 ATGACAAGGTTTCATGAACAGCTTTGCCAAACAAACGCTGGGATATGGCAATATGGCGACAGTGGAGCAAGAGAGC
 TCAGCTCAGGCTGTTGATTCTCATTCAAACAACACACCGAAGCAAGCTAAGGGTGTCTTGCAGAGGAACATAAG
 GATGCATTGCGGTTCCGGGACGAAAGAGTTAGTATTATTAATGCAGAGCCTTCTTCAACACTGTTCTGCTTTTGG
 TTTGTGGTTTCATGCTATTTCCCTGTGATTACTGCCTGCTTGGGTCCCGTAGCTAACACTATCTCGATAGCCTGT
 GTAGTTGAAAAATGGAGATCCTTAAAGAACAACCTCCGTGGTGACAAATCCACGAAGCAATGACACCGATGTTTTG
 ATGAATCAAGTAAAGACAGTTTTTGTATCCTCCTGGTATTTTTGCCGTTAATATCATCTCTTTGGTACTGGGTTTT
 ACGTCAAATATTATACTAATGCTACATTTAGTAAGAAGTTGACGTATCTTAAATCTCAGTTAATAAATATAACA
 50 GGATGGACAATAGCTGGAGGGATGCTTTTGGTGGACGTGATTGTATGCTCCTTGAATGACATGCCAGCATCTAC
 AGTAAGACTATCGGATTTTGGTTTGCCTGTATCAGTTCTGGTCTATATTTGGTATGCACCATTATTTTAAACAATA
 CATTTTATTTGGATATAAATTAGGAAAATATCCTCCAACGTTCAACCTTTTGCCCAATGAAAGAAGTATCATGGCA
 TACACTGTACTATTGTCTTTATGGTTGATTTGGGGTGCGGTATGTTTAGCGGTTTATTGCACATCACTTACGGA

AATGCATTATATTTCTGCACGGTATCATTATTAACCGTGGGACTAGGTGACATCCTGCCCAAGTCGGTTGGCGCC
 AAAATCATGGTTTTTAATCTTTTCGTATCTGGTGTGTCTTGATGGGTTTAATAGTGTATGACAAAGATCCATC
 ATTCAAAAGTCCTCTGGCCCAATTTCTTTTCCACAGAGTTGAAAAGGCAGGTCCAAATCGTGGAACATTAT
 5 ATGGATAGTAGTAAAAATTTATCTGAAAGGGAAGCGTTCGACTTAATGAAGTGTATCCGACAAACGGCCTCAAGG
 AAGCAGCATTGGTTTTCTTTGTCGGTGACTATTGCAATTTTCATGGCTTTTTTGGTTATTGGGAGCTCTTGATTTC
 AAATTCGCAGAAAATTGGTCGTACTTCAATTGTATTTACTTTTGTCTTGTGCTTATTAACCATTGGATACGGA
 GACTATGCTCCAAGGACTGGTGCAGGCCGTGCTTTTTTTGTGATTTGGGCGTTGGGAGCCGTGCCATTAATGGGG
 GCTATCCTATCTACAGTCGGTGATCTGTTGTTTGACATTTCCACTTCTCTGGATATTAAGATCGGTGAATCATTTC
 10 AATAATAAAGTCAAGTCCATCGTTTTTAATGGGCGTCAAAGAGCACTTTCTTTTATGGTGAACACTGGAGAAATT
 TTCGAAGAATCTGACACAGCTGATGGTGATCTGGAAGAAAATACAACGAGCTCACAATCCAGTCAAATTTCTGAA
 TTCAACGATAATAATTGAGAAGAGAATGATTCTGGAGTGACATCCCTCCTGCAAGCCTGCAAGAATCATTTTCT
 TCATTATCAAAGCATCTAGCCCAGAGGGAATACTTCCTCTAGAATATGTTTCTTCTGCTGAATATGCACTACAG
 GACTCGGGGACCTGTAATTTAAGGAACCTGCAAGAGCTACTTAAAGCCGTCAAAAACTACATCGGATATGCTG
 15 GCGGATAAAGATTACACACTTAGTTTTTCCGACTGGTCTGATTCATAAACTACATTTGAGGAACATTACAGAT
 ATTGAGGAGTACACACGCGGACCCGAATTTTGGATATCACCTGATACGCCCCTCAAGTTCCCGTTAAATGAACCT
 CATTTTGCTTTTATGATGCTTTTCAAGAACATAGAAGAATTAGTTGGTAATCTAGTAGAAGACGAAGAGCTTTAT
 AAAGTTATAAGCAAAGAAAATTTTTGGGTGAGCATAGAAAGACACTTTGA

Tabelle 4: SEQ ID NO. 4

Nukleotidsequenz von HERG1

ATGCCGGTGCGGAGGGGCCACGTCGCGCCGCGAGAACACCTTCTGGACACCATCATCCGCAAGTTTGAGGGCCAG
 AGCCGTAAGTTTCATCATCGCCAACGCTCGGGTGGAGAACTGCGCCGTCTACTGCAACGACGGCTTCTGCGAG
 CTGTGCGGCTACTCGCGGGCCGAGGTGATGCAGCGACCCTGCACCTGCGACTTCTGACGCGGCCGCGCACGCAG
 25 CGCCGCGCTGCGCGCAGATCGCGCAGGCACTGCTGGGCGCCGAGGAGCGCAAAGTGGAAATCGCCTTCTACCGG
 AAAGATGGGAGCTGCTTCTATGTCTGGTGATGTGGTCCCGTGAAAGAACGAGGATGGGGCTGTCTCATATGTT
 ATCCTCAATTTTCGAGGTGGTGATGGAGAAGGACATGGTGGGGTCCCCGGTCTCATGACACCAACCCAGGGCCCC
 CCCACCAGCTGGCTGGCCCCAGGCGCGCCAAGACCTTCCGCTGAAGCTGCCGCGCTGCTGGCGCTGACGGCC
 CGGGAGTCTGTCGGTGGGTCGGGCGGCGGGCGCGGGCGCCCCGGGGGCGTGGTGGTGGACGTGGACCTG
 30 ACGCCCCGCGGCACCCAGCAGCGAGTCTGCTGGCCCTGGACGAAGTGACAGCCATGGACAACCACGTGGCAGGGCTC
 GGGCCCCGCGGAGGAGCGGCGTGGCTGGTGGTCCCCGGCTCTCCGCCCCGAGCGCGCCCGGCCAGCTCCCATCG
 CCCCCGGGCGCACAGCCTCAACCCGACGCCTCGGGCTCCAGCTGCAGCCTGGCCCCGACGCGCTCCCGAGAAAGC
 TGCGCCAGCGTGCGCCGCGCCTCGTCGGCCGACGACATCGAGGCCATGCGCGCGGGGTGCTGCCCCCGCCACCG
 CGCCACGCCAGCACCGGGCCATGCACCCATGCGCAGCGGCTTGCTCAACTCCACCTCGGACTCCGACCTCGTG
 35 CGCTACCGCACCATTAGCAAGATTCCCCAAATCACCTCAACTTTGTGGACCTCAAGGGCAGCCCTTCTGGCT
 TCGCCCACCAAGTGACCGTGAGATCATAGCACCTAAGATAAAGGAGCGAACCACAAATGTCACTGAGAAGGTACAC
 CAGGTCCTGTCCCTGGGCGCCGACGTGCTGCCTGAGTACAAGCTGCAGGCACCGCGCATCCACCGCTGGACCATC
 CTGCATTACAGCCCCCTTCAAGGCCGTGTGGGACTGGCTCATCTGCTGCTGGTCTATCTACAGGCTGTCTTACA
 CCCTACTCGGCTGCCTTCTGCTGAAGGAGACGGAAGAAGGCCCGCTGCTACCGAGTGTGGCTACGCCTGCCAG
 40 CCGCTGGCTGTGGTGGACCTCATCGTGACATCATGTTTCATTGTGGACATCCTCATCAACTTCCGACCACTAC
 GTCAATGCCAACGAGGAGGTGGTCAGCCACCCCGGCCGATCGCCGTCCACTACTTCAAGGGCTGGTTCTCATC
 GACATGGTGGCCGCCATCCCCCTCGACCTGCTCATCTTGGCTCTGGCTCTGAGGAGCTGATCGGGCTGCTGAAG
 ACTGCGCGGCTGCTGCGGTGGTGGCGGTGGCGGAAGCTGGATCGCTACTCAGAGTACGGCGCGGCCGTGCTG
 45 TTCTTGCTCATGTGCACCTTTGCGCTCATCGCGCACTGGCTAGCCTGCATCTGGTACGCCATCGGCAACATGGAG
 CAGCCACACATGGACTCACGCATCGGCTGGCTGCACAACCTGGGCGACCAGATAGGCAAACCCTACAACAGCAGC
 GGCCTGGGCGGCCCTCCATCAAGGACAAGTATGTGACGGCGCTCTACTTCACCTTCAGCAGCCTCACCAGTGTG
 GGCTTCGGCAACGTCTCTCCCAACACCAACTCAGAGAAGATCTTCTCCATCTGCGTCTATGCTCATTGGCTCCCTC
 ATGTATGCTAGCATCTTCGGCAACGTGTGCGCCATCATCCAGCGGCTGTACTCGGGCACAGCCCGCTACCACACA
 CAGATGCTGCGGGTGCGGGAGTTTCATCCGCTTCCACCAGATCCCCAATCCCCCTGCGCCAGCGCCTCGAGGAGTAC
 50 TTCCAGCACGCTGGTCTTACACCAACGGCATCGACATGAACGCGGTGCTGAAGGGCTTCCCTGAGTGCCTGCAG
 GCTGACATCTGCCTGCACCTGAACCGCTCACTGCTGCAGCATGCAAAACCTTCCGAGGGGCCACCAAGGGCTGC
 CTTGAGGCTCTGGCCATGAAGTTCAAGACCACATGCAACCGGACACACTGGTGCATGCTGGGACCTG
 CTCACCGCCCTGTACTTCTATCTCCCGGGGCTCCATCGAGATCCTGCGGGGCGACGTCGCTGGCCATCCTGGG
 AAGAATGACATCTTTGGGGAGCCTCTGAACCTGTATGCAAGGCCTGGCAAGTGAACGGGGATGTGCGGGCCCTC
 ACCTACTGTGACCTACACAAGATCCATCGGGACGACCTGCTGGAGGTGCTGGACATGTACCCTGAGTTCTCCGAC
 55 CACTTCTGGTCCAGCCTGGAGATCACCTTCAACCTGCGAGATACCAACATGATCCCGGGCTCCCCGGGAGTACG
 GAGTTAGAGGGTGGCTTCAGTCGGCAACGCAAGCGCAAGTTGTCTTCCGAGGCGCACGGACAAGGACACGGAG
 CAGCCAGGGGAGGTGTGCGCCTTGGGGCGGGCGGGCGGGGCGAGGCGGAGTAGCCGGGGCGGGCGGGGGGG

CCGTGGGGGGAGAGCCCGTCCAGTGGCCCCCTCCAGCCCTGAGAGCAGTGAGGATGAGGGCCCAGGCCGACGCTCC
 AGCCCCCTCCGCTGGTGCCTTCTCCAGCCCCAGGCCCGGAGAGCCCGGGTGGGGAGCCCCCTGATGGAG
 GACTGCGAGAAGAGCAGCGACACTTGCAACCCCCTGTCAGGCGCCTTCTCAGGAGTGTCCAACATTTTCAGCTTC
 TGGGGGGACAGTCGGGGCGGCCAGTACCAGGAGCTCCCTCGATGCCCCGCCCCCAGCCCTCCTCAACATC
 5 CCCCCTCTCCAGCCCGGGTGGCGGCCCGGGGCGACGTGGAGAGCAGGCTGGATGCCCTCCAGCGCCAGCTCAAC
 AGGCTGGAGACCCGGCTGAGTGCAGACATGGCCACTGTCTGTCAGCTGCTACAGAGGCAGATGACGCTGGTCCCCG
 CCCGCTACAGTGTGTGACCACCCGGGGCCTGGCCCCACTTCCACATCCCCGCTGTTGCCCGTCAGCCCCCTC
 CCCACCCTCACCTTGGACTCGCTTTCTCAGGTTTCCCAGTTTCATGGCGTGTGAGGAGCTGCCCCGGGGGGCCCCA
 10 GAGCTTCCCCAAGAAGGCCCCACACGACGCTCTCCCTACCGGGCCAGCTGGGGGCCCTCACCTCCCAGCCCCCTG
 CACAGACACGGCTCGGACCCGGGCAGTTA

Tabelle 5: SEQ ID NO. 5

15 Nukleotidsequenz von K_v1-5

ATGGAGATCGCCCTGGTGCCTTGGAGAACGGCGGTGCCATGACCGTCAGAGGAGGCGATGAGGCCCGGGCAGGC
 TGCGGCCAGGCCACAGGGGGAGAGCTCCAGTGTCCCCCGACGGCTGGGCTCAGCGATGGGGCCCAAGGAGCCGGCG
 CCAAAGGGGCGCGCGCAGAGACGCGGACTCGGGAGTGCGGCCCTTGCTTCCGCTGCCGGACCCGGGAGTGCGG
 20 CCCTTGCTTCCGCTGCCAGAGGAGCTGCCACGGCCTCGACGGCCGCTCCCGAGGACGAGGAGGAAGAAGGCGAT
 CCGGGCCTGGGCACGGTGGAGGACCAGGCTCTGGGCACGGCGTCCCTGCACCACCAGCGCGTCCACATCAACATC
 TCCGGGCTGCGCTTTGAGACGCAGCTGGGCACCCTGGCGCAGTTCCCCAACACACTCCTGGGGGACCCCGCCAAG
 CGCCTGCCGTACTTCGACCCCCCTGAGGAACGAGTACTTCTTCGACCGCAACCGGCCCAGCTTCGACGGTATCCTC
 TACTACTACAGTCCGGGGGCGCCTGCGAGGGGTCAACGTCTCCCTGGACGTGTTTCGCGGACGAGATACGCTTC
 25 TACCAGCTGGGGGACGAGGCCATGGAGCGCTTCCGCGAGGATGAGGGCTTCATTAAAGAAGAGGAGAAGCCCCCTG
 CCCCCAACAGAGTTCCAGCGCCAGGTGTGGCTTATCTTCGAGTATCCGGAGAGCTCTGGGTCCGCGGGGCCATC
 GCCATCGTCTCGGTCTTGTTATCCTCATCTCCATCATCACCTTCTGCTTGGAGACCCTGCCTGAGTTCAGGGAT
 GAACGTGAGCTGCTCCGCCACCCTCCGGCGCCCCACCAGCCTCCCGCGCCCCGCCCTGGGGCCAACGGCAGCGGG
 GTCATGGCCCCCGCCTCTGGCCCTACGGTGGCACCGCTCCTGCCCAGGACCCTGGCCGACCCCTTCTTCATCGTG
 30 GAGACCAGTGCCTGATCTGGTTACCTTCGAGCTGCTCGTGCCTTCTTCGCTGCCCCAGCAAGGCAGGGTTC
 TCCCGGAACATCATGAACATCATCGATGTGGTGGCCATCTTCCCCCTACTTCATCACCCCTGGGCACCGAACTGGCA
 GAGCAGCAGCCAGGGGGCGGAGGAGGCGGCCAGAATGGGCAGCAGGCCATGTCCCTGGCCATCCTCCGAGTCATC
 CGCCTGGTCCGGGTGTTCCGCATCTTCAAGCTCTCCCGCCACTCCAAGGGGCTGCAGATCCTGGGCAAGACCTTG
 CAGGCCCTCCATGAGGGAGCTGGGGCTGCTCATCTTCTTCTCTTCATCGGGGTATCCTCTTCTCCAGTGCCTC
 35 TACTTCGCAGAGGCTGACAACCAGGGAACCCATTTCTCTAGCATCCCTGACGCCTTCTGGTGGGCAGTGGTCACC
 ATGACCACTGTGGGCTACGGGGACATGAGGCCCATCACTGTTGGGGGCAAGATCGTGGGCTCGCTGTGTGCCATC
 GCCGGGTCTCACCATTGCCCTGCCTGTGCCCGTCATCGTCTCCAACCTCAACTACTTCTACCACCGGGAACG
 GATCACGAGGAGCCGGCAGTCTTAAGGAAGAGCAGGGCACTCAGAGCCAGGGGCGGGGCTGGACAGAGGAGTC
 CAGCGGAAGGTGAGCGGGAGCAGGGGATCCTTCTGCAAGGCTGGGGGGACCCTGGAGAATGCAGACAGTGCCCGA
 40 AGGGGCAGCTGCCCCCTAGAGAAGTGTAAAGTCAAGGCCAAGAGCAACGTGGACTTGGCGAGGTCCCTTTATGCC
 CTCTGCCTGGACACCAGCCGGGAACAGATTTGTGA

Tabelle 6: SEQ ID NO. 6:

45 Nukleotidsequenz von IRK1

ATGGGCAGTGTGCGAACCAACCGCTATAGCATTGTCTCTTCGGAAGAGGACGGCATGAAGTTGGCCACCATGGCA
 GTTGCCAATGGCTTTGGGAATGGGAAAAGTAAAGTCCACACTCGGCAACAGTGTAGGAGCCGCTTTGTGAAGAAA
 50 GATGGCCACTGTAAATGTTCACTTCATCAACGTTGGGGAAAAGGGACAACGGTACCTTGCTGACATTTTTACTACG
 TGTGTGGACATTGCTGGCGGTGGATGCTGGTTATCTTTTGCTAGCTTTTGTCTCTCGTGGCTGTTTTTTGGC
 TGTGTGTTTTGGCTGATAGCTTTGCTCCATGGAGATCTGGATGCATCTAAGGAGAGCAAAGCCTGTGTGTCTGAG
 GTCAACAGCTTCACAGCTGCCTTTCTTTCTCCATTGAGACCCAGACAACCATCGGCTATGGGTTCGATGTGTC
 ACGGATGAATGCCCCGATTGCGGTGTTTCATGGTTGTGTTCCAGTCAATTGTGGGCTGCATTATTGATGCTTTTATC
 55 ATTGGTGCCGTCATGGCAAAGATGGCAAAGCCAAAGAAAAGAAATGAGACTCTTGTCTTCAGTCACAATGCTGTG
 ATTGCCATGAGAGATGGCAAAGCTGTGTTTGATGTGGCGAGTAGGCAACCTTCGGAAAAGCCACTTGGTAGAAGCT
 CATGTTTCGAGCCCAGCTCCTCAAATCCAGAATTACTTCTGAAGGGGAATACATCCCTTGGATCAAATAGACATC
 AATGTTGGCTTTGACAGTGAATTGACCGTATATTTCTGGTATCCCCAATCACTATTGTCCATGAAATAGATGAA
 GATAGTCCTTTATATGATTTGAGCAAGCAGGACATTGATAATGCAGACTTTGAAATTGTTGTGATACTAGAAGGC
 60 ATGGTGAAGCCACTGCCATGACAACACAGTGTCTAGTCTTATTTGGCCAACGAGATCCTTTGGGGCCACCGC

TATGAGCCAGTGCTCTTTGAGGAGAAGCACTACTATAAAGTGGACTATTTCGAGGTTTCATAAGACTTACGAAGTA
CCCAACACTCCCCTTTGTAGTGCCAGAGACTTAGCAGAAAAAGAAATATATTCTCTCAAATGCTAACTCATTTTGC
TATGAAAATGAAGTTGCCCTTACAAGCAAAGAGGAAGATGACAGTGAAAATGGGGTTCCAGAAAGCACCAGTACA
GACACACCTCCTGACATCGACCTTCACAACCAGGCAAGTGACCTCTAGAGCCCAGACCCTTACGGCGAGAATCG
GAGATATGA

5

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren eines eukaryotischen Kaliumkanals, wobei
 - a) eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle verwendet wird, die die drei endogenen Kaliumkanäle TRK1, TRK2 und TOK1 nicht exprimiert ;
 - b) in dieser mutierten *S. cerevisiae* Zelle ein eukaryotischer Kaliumkanal heterolog exprimiert wird;
 - c) die mutierte *S. cerevisiae* Zelle mit einer zu untersuchenden Substanz inkubiert wird;
 - und
 - d) der Effekt der zu untersuchenden Substanz auf den eukaryotischen Kaliumkanal bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei in der mutierten *S. cerevisiae* Zelle die Gene TRK1, TRK2 und TOK1 ausgeschaltet sind ($\Delta trk1$, $\Delta trk2$, $\Delta tok1$).
3. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 und 2, wobei der eukaryotische Kaliumkanal ein humaner Kaliumkanal ist.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, wobei der eukaryotische Kaliumkanal ein HERG1, Kv1.5 oder gplRK1 ist.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, wobei der eukaryotische Kaliumkanal mutiert ist.
6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, wobei der eukaryotische Kaliumkanal in einem Hefe Expressionsplasmid vorliegt.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, wobei die mutierte *S. cerevisiae* Zelle einen Wachstumsreporter konstitutiv exprimiert.

8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, wobei eine zu untersuchende Substanz, die auf den eukaryotischen Kaliumkanal einen Effekt hat, das Wachstum der mutierten *S. cerevisiae* Zelle inhibiert.
- 5 9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Effekt einer zu untersuchenden Substanz auf den eukaryotischen Kaliumkanal durch Messung der Zellzahl der mutierten *S. cerevisiae* Zellen bestimmt wird.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Zellzahl über die Fluoreszenz oder Lumineszenz eines konstitutiv exprimierten Wachstumsreporters bestimmt wird.
- 15 11. Mutierte *S. cerevisiae* Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß die endogenen Kaliumkanäle TRK1, TRK2 und TOK1 nicht exprimiert werden.
12. Mutierte *S. cerevisiae* Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene TRK1, TRK2 und TOK1 ausgeschaltet sind.
- 20 13. Mutierte *S. cerevisiae* Zelle hinterlegt unter DSM 13197.
14. Mutierte *S. cerevisiae* Zelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 11 bis 13, wobei die *S. cerevisiae* Zelle einen eukaryotischen Kaliumkanal heterolog exprimiert.
- 25 15. Mutierte *S. cerevisiae* Zelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 11 bis 14, wobei der eukaryotische Kaliumkanal ein humaner Kaliumkanal ist.
- 30 16. Mutierte *S. cerevisiae* Zelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 11 bis 15, wobei der eukaryotische Kaliumkanal ein HERG1, Kv1.5 oder gplRK1 ist.
17. Mutierte *S. cerevisiae* Zelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 11 bis 16, wobei der eukaryotische Kaliumkanal mutiert ist.

18. Verfahren zur Herstellung einer mutierten *S. cerevisiae* Zelle, die die Kaliumkanäle TRK, TRK2 und TOK1 nicht exprimiert, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene TRK1, TRK2 und TOK1 durch knock out zerstört werden.

5

19. Verwendung einer mutierten *S. cerevisiae* Zelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 11 bis 17 zur Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität des eukaryotischen Kaliumkanals inhibieren.

- 10 20. Verfahren zur Identifizierung von Aktivatoren eines eukaryotischen Kaliumkanals, wobei

- a) eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle verwendet wird, die die drei endogenen Kaliumkanäle TRK1, TRK2 und TOK1 nicht exprimiert;
b) in dieser mutierten *S. cerevisiae* Zelle ein eukaryotischer Kaliumkanal heterolog exprimiert wird;
15 c) die mutierte *S. cerevisiae* Zelle mit einer zu untersuchenden Substanz inkubiert wird;
und
d) der Effekt der zu untersuchenden Substanz auf den eukaryotischen Kaliumkanal bestimmt wird.
20

21. Verfahren zur Identifizierung von Aktivatoren eines eukaryotischen Kaliumkanals, wobei

- a) eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle verwendet wird, die die drei endogenen Kaliumkanäle TRK1, TRK2 und TOK1 nicht exprimiert;
25 b) in dieser mutierten *S. cerevisiae* Zelle ein eukaryotischer Kaliumkanal heterolog exprimiert wird;
c) die mutierte *S. cerevisiae* Zelle in Gegenwart eines Inhibitors des eukaryotischen Kaliumkanals mit einer zu untersuchenden Substanz inkubiert wird;
30 und
d) der Effekt der zu untersuchenden Substanz auf den eukaryotischen Kaliumkanal bestimmt wird.

22. Test-Kit enthaltend eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle nach einem der Ansprüche 11 bis 17.

23. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, wobei

5

- a) ein Inhibitor eines eukaryotischen Kaliumkanals mit Hilfe eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 10 identifiziert wird ,
- b) der Inhibitor nach bekannten chemischen Verfahren hergestellt oder isoliert wird, und
- c) der Inhibitor mit physiologisch verträglichen Zusatzstoffen versetzt wird.

10

24. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, wobei

- a) ein Aktivator eines eukaryotischen Kaliumkanals mit Hilfe eines Verfahrens nach Anspruch 20 oder 21 identifiziert wird ,
- b) der Aktivator nach bekannten chemischen Verfahren hergestellt oder isoliert wird, und
- c) der Aktivator mit physiologisch verträglichen Zusatzstoffen versetzt wird.

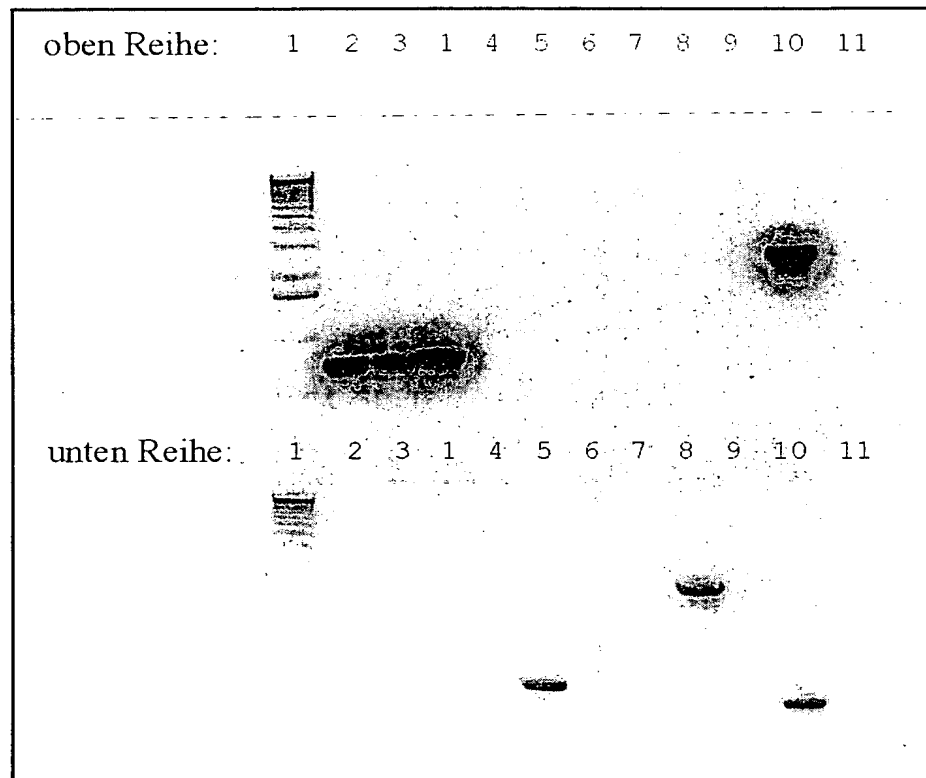
15

Zusammenfassung:

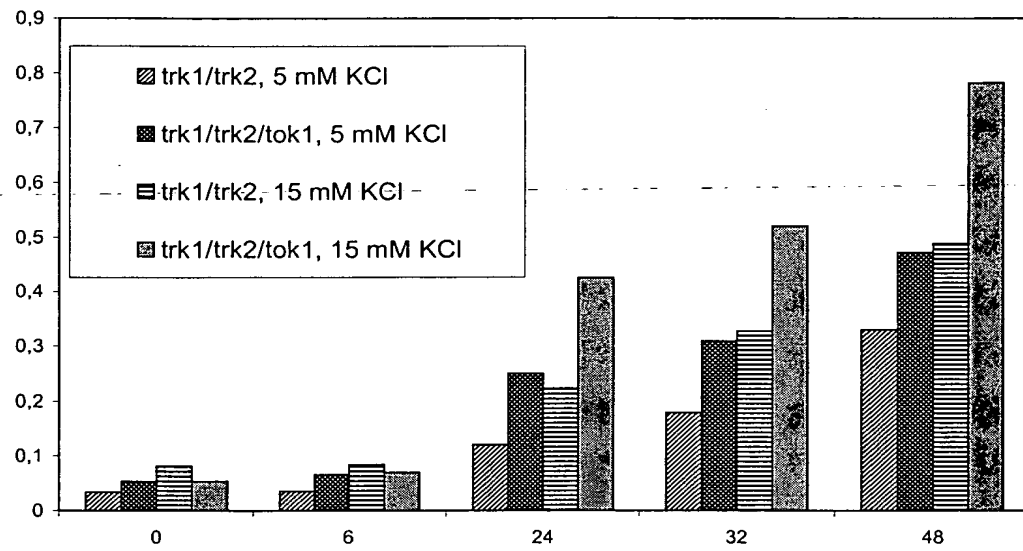
5 Die Erfindung betrifft Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren und Aktivatoren eukaryotischer Kaliumkanäle, wobei eine mutierte *S. cerevisiae* Zelle verwendet wird, deren endogene Kaliumkanäle TRK1, TRK2 und TOK1 nicht funktionell exprimiert werden, die aber einen zu untersuchenden eukaryotischen Kaliumkanal heterolog exprimiert. Desweiteren sind mutierte *S. cerevisiae* Zellen, die TRK1, TRK2 und TOK1 nicht exprimieren, Gegenstand der Erfindung sowie die Herstellung und Verwendung dieser mutierten *S. cerevisiae* Zellen.

10

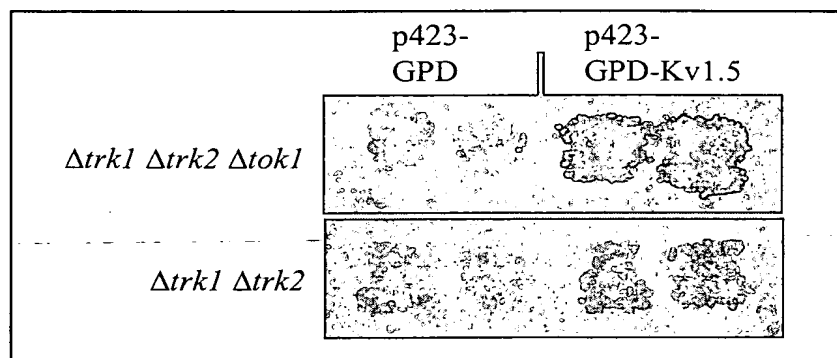
Figur 1



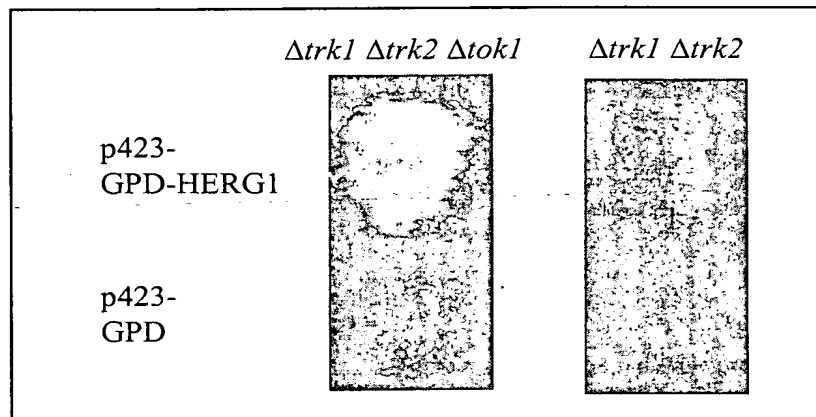
Figur 2



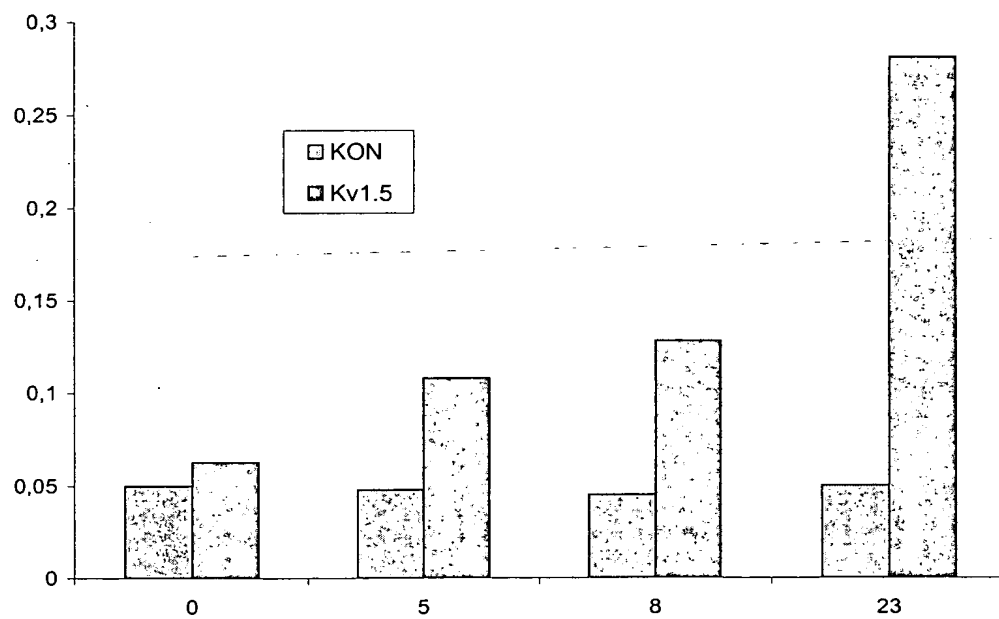
Figur 3



Figur 4



Figur 5



Figur 6

